



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

Detecção de *Dirofilaria* spp. em cães da região Centro de Portugal

Miguel Correia Landum

Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica

Orientador: Professora Doutora Silvana Maria Duarte Belo

Co-Orientador: Professor Doutor Luis Manuel Madeira de Carvalho

Outubro
2012

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que, de algum modo, possibilitaram e facilitaram a realização deste trabalho.

À minha Orientadora, Professora Doutora Silvana Maria Duarte Belo por toda a ajuda, disponibilidade e ensinamentos durante todo o percurso que culminou neste momento.

Ao meu Co-Orientador, Professor Doutor Luis Manuel Madeira de Carvalho por toda simpatia e boa disposição durante as saídas de campo, por todos os novos ensinamentos nesta área do conhecimento, e por todas as críticas construtivas que levaram à realização deste trabalho.

Aos outros dois elementos da FMV que fazem parte do projecto, o Professor Doutor José Meireles e a Bolseira Ana Margarida Alho, pelos momentos bem passados em todas as saídas de campo, por toda cooperação na realização das técnicas e na discussão dos resultados.

As professoras de Helminologia e Malacologia Médicas do IHMT, Professora Doutora Manuela Calado e Professora Doutora Ana Afonso por todo o auxílio na realização e discussão dos resultados da parte molecular do trabalho.

À Professora Doutora Luzia Gonçalves, por toda a ajuda e sugestões na parte estatística do trabalho.

À Professora Doutora Maria Amélia Grácio, pela oportunidade de estagiar no grupo de Helminologia e Malacologia Médica, e por todo o entusiasmo e preocupação que demonstrou pela realização deste trabalho.

À técnica especialista de laboratório Isabel Clemente, por toda a simpatia, boa disposição, disponibilidade em ajudar a resolver os problemas e por todos os conhecimentos transmitidos desde o estágio curricular realizado na Unidade de Helminologia.

A todos os professores do XI Mestrado em Parasitologia Médica, por todo o conhecimento transmitido, pelo entusiasmo e disponibilidade de responder as pretensões dos mestrandos ao longo destes dois anos.

Aos meus colegas de Mestrado e actualmente amigos, pelo companheirismo e pelos dois anos bem passados. Um agradecimento especial à minha amiga moçambicana Idalécia, por toda a alegria, pelas boas conversas e espírito de entreatajuda.

Aos meus verdadeiros amigos cujos nomes não preciso de enumerar, por todo o carinho e momentos bem passados ao longo deste tempo.

À minha família, em especial aos meus avós pelo carinho incondicional, paciência desmesurada, por me acolherem de braços abertos e por terem contribuído para a pessoa que sou hoje.

À minha Mãezinha e ao Jorge, por me aturarem, por me ajudarem em todos os momentos, por me fazerem perseguir os meus sonhos e essencialmente por fazerem de mim a pessoa que sou hoje.

Por fim e não menos importante à minha namorada e companheira, pela compreensão nos momentos mais difíceis, por todo o carinho e paciência para me aturar.

A todos os acima mencionados e a todos os que de algum modo marcaram a realização deste trabalho e a minha vida, o meu MUITO OBRIGADO!!!

“DETECÇÃO DE *Dirofilaria spp.* EM CÃES DA REGIÃO CENTRO DE PORTUGAL”

RESUMO

A dirofilariose é ainda hoje uma doença pouco conhecida da população em geral, mas com grande importância Médico-Veterinária e para os proprietários de canídeos domésticos de zonas endémicas. Doença que apresenta um carácter vectorial e zoonótico é causada pelos nemátodes do género *Dirofilaria spp.*, e que têm como hospedeiros definitivos preferenciais os canídeos domésticos.

A nível europeu a incidência desta doença tem vindo a aumentar, em especial os casos de doença provocados por *Dirofilaria repens*. Em Portugal, os conhecimentos epidemiológicos que temos desta parasitose resultam de um conjunto de estudos que esporadicamente têm sido realizados. Contudo, ainda existem algumas lacunas na informação existente sobre a situação actual da dirofilariose animal e humana no nosso país.

O presente trabalho procurou actualizar a prevalência da doença canina na região centro de Portugal, tendo para isso sido efectuado um estudo epidemiológico, tendo-se recolhido amostras sanguíneas de 308 canídeos domésticos que se encontravam alojados em canis municipais e privados. Após a análise das amostras, recorrendo a testes parasitológicos e imunológicos, foi possível detectar uma prevalência global 15,3% para *Dirofilaria immitis*. Apesar do crescente aumento europeu dos casos de dirofilariose por *D. repens* na Europa, este estudo tal como os que o antecederam ainda não conseguiu detectar este agente etiológico em Portugal.

No presente trabalho, foi também usada uma abordagem molecular, o que permitiu detectar, pela primeira em Portugal, e em cães por *D. immitis*, a bactéria endossimbionte *Wolbachia pipientis*, importante na patologia de certas filárias.

Palavras-chave: Epidemiologia, *Dirofilaria immitis*, canídeo doméstico, região centro do país.

“DETECTION OF *Dirofilaria* spp. IN DOGS FROM THE CENTRAL REGION OF PORTUGAL”

ABSTRACT

Heartworm disease is still little known by the general population, but is well known and has great importance for Veterinarians and for owners of domestic dogs from endemic areas. This vectorial and zoonotic disease is caused by nematodes of the genus *Dirofilaria* spp., and dogs are the preferential definitive hosts.

In some European regions the incidence of Human and animal disease has been growing, especially those caused by *Dirofilaria repens*. In Portugal, the epidemiological status of this parasitic disease results from a variety of studies that have been done gradually. Despite those studies there are still some gaps in the information about the current situation of heartworm disease in animals and humans in our country.

This study attempted to update the prevalence of dog's heartworm disease in the central region of Portugal. An epidemiological survey has been conducted involving 308 domestic dogs housed in municipal and private kennels. Analysis of blood samples, using parasitological and immunological tests, revealed a global prevalence of 15,3% for *Dirofilaria immitis*. Despite the growing number of European cases of heartworm caused by *D. repens*, this study, as those conducted previously, failed to detect so far this etiologic agent in Portugal.

In this study, we also used a molecular approach, which allowed us to detect for the first time in Portugal in infected dogs with *D. immitis*, the endosymbiont *Wolbachia pipientis*, an important bacteria in the pathology of certain filariae.

Keywords: Epidemiology, *Dirofilaria immitis*, domestic canids, central region of the country.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	IV
Índice Geral	V
Índice de Figuras	VII
Índice de Tabelas	IX
Índice de Abreviaturas	X

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Introdução	2
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 - Nematoda: Género <i>Dirofilaria</i> Railliet & Henry, 1911	6
2.2 - <i>Dirofilaria immitis</i> (Leidy, 1856)	8
2.2.1 - Taxonomia	8
2.2.2 - Morfologia	8
2.2.3 - Ciclo Biológico	10
2.2.4 - Epidemiologia	13
2.2.4a - Hospedeiros vertebrados	13
2.2.4b - Hospedeiros invertebrados	14
2.2.4c - Distribuição geográfica	16
2.2.5 - Fisiopatologia	22
2.2.6 - Diagnóstico	23
2.2.6a - Detecção de microfilárias em circulação.....	24
- Exame a fresco.....	24
- Métodos de concentração.....	25
- Teste Knott modificado.....	25
- Teste de filtração.....	27
- Coloração histoquímica – Fosfatase ácida	27
2.2.6b - Testes serológicos.....	29
- Detecção de anticorpos	29
- Detecção de antigénios.....	30
2.2.6c - Métodos Moleculares	31
2.2.6d - Métodos complementares.....	32
- Radiografia	32
- Ecocardiografia	32
2.3 - <i>Dirofilaria repens</i> Railliet and Henry, 1911	33
2.3.1 - Taxonomia	33
2.3.2 - Morfologia	34

2.3.3 - Ciclo Biológico	34
2.3.4 - Epidemiologia.....	36
2.3.4a - Hospedeiros vertebrados.....	36
2.3.4b - Hospedeiros invertebrados.....	36
2.3.4c - Distribuição geográfica.....	37
2.3.5 – Fisiopatologia.....	38
2.3.6 - Diagnóstico.....	38
3 – Associação entre <i>Wolbachia pipientis</i> e filárias.....	39
3.1 – Papel da <i>Wolbachia</i> na patogénese e diagnóstico da <i>Dirofilariose</i>	41
4 – Importância zoonótica de <i>Dirofilaria</i> spp.....	44
5 - OBJECTIVOS	49
5.1 – Objectivos.....	50
6 - MATERIAL E MÉTODOS.....	53
6.1 – População estudada.....	54
6.2 – Breve caracterização da área de estudo.....	54
6.3 – Técnicas de Diagnóstico.....	56
Colheita de Material Biológico.....	56
Teste serológico comercial (<i>WITNESS® Dirofilaria</i>)	57
Detecção de microfilárias (Técnica de Knott modificada)	58
Diagnóstico diferencial (Técnica das Fosfatases Ácidas)	59
Diagnóstico molecular (<i>Polymerase chain reaction</i>)	62
Extracção de ADN	63
PCR- <i>Multiplex</i>	64
Gene 16S	65
Detecção de <i>Wolbachia</i>	66
6.4 – Análise Estatística	67
6.5 – Considerações Éticas e Legais	67
7 - RESULTADOS	69
7.1 – Características gerais da população estudada	70
7.2 – Manifestações clínicas observadas	72
7.3 – Resultados parasitológicos	74
7.4 – Resultados da análise molecular	82
8 - DISCUSSÃO/CONCLUSÃO.....	85
9 - BIBLIOGRAFIA	93
10 - ANEXOS	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Vermes adultos de <i>Dirofilaria immitis</i> (♀ e ♂)	9
Figura 2 - Microfilárias de <i>Dirofilaria immitis</i> , observadas na técnica de Knott modificada - 100x	10
Figura 3 - Ciclo de vida de <i>Dirofilaria immitis</i> em cães e gatos	13
Figura 4 – Distribuição aproximada das zonas endémicas de <i>D. immitis</i> e <i>D. repens</i> na Europa.....	19
Figura 5 – Extremidade anterior de uma microfilária (<i>D. immitis</i>) observada na técnica de Knott modificada – 400x.....	26
Figura 6 – Extremidade posterior de uma microfilária (<i>D. immitis</i>) observada na técnica de Knott modificada – 400x.....	26
Figura 7 – Microfilária (<i>D. immitis</i>) corada com a técnica das fosfatases ácidas – 400x	29
Figura 8 – Teste rápido de detecção de antígenos específicos de fêmeas de <i>Dirofilaria immitis</i>	31
Figura 9 – Ciclo de vida <i>Dirofilaria repens</i>	35
Figura 10 – Mapa de Portugal onde se assinalados os distritos estudados.....	55
Figura 11 – Recolha de sangue da veia cefálica em alguns dos animais analisados	56
Figura 12 - Esquema ilustrativo da análise e resultados do teste rápido (<i>WITNESS® Dirofilaria</i>).....	57
Figura 13 – Amostras processada pela técnica de Knott modificada.....	58
Figura 14 – Amostras em lâmina e lamela da técnica de Knott prontas para a observação ao microscópio óptico	59
Figura 15 – Esquema ilustrativo da realização do esfregaço sanguíneo	60
Figura 16 – Esquema da actividade das fosfatases ácidas em diferentes espécies de microfilárias.....	62
Figura 17 – Gráfico representativo das idades dos animais analisados	70
Figura 18 – Gráfico representativo dos grupos etários dos animais incluídos no estudo.....	71
Figura 19 – Distribuição da amostra analisada por sexo	71

Figura 20 – Gráfico representativo do tipo de pelagem encontrada nos animais incluídos no estudo.....	72
Figura 21 – Exemplo de feridas encontradas nos animais examinados	72
Figura 22 – Caracterização do tipo de lesões cutâneas encontradas nos animais incluídos no estudo.....	73
Figura 23 – Caracterização da condição dos linfonodos dos animais incluídos no estudo.....	73
Figura 24 – Caracterização das alterações cardíacas encontradas	74
Figura 25 – Exemplos de alguns testes WITNESS [®] <i>Dirofilaria</i> realizados.....	75
Figura 26 – Resultados dos testes de Witness [®] <i>Dirofilaria</i> e Knott, no cômputo geral dos três distritos analisados	75
Figura 27 – Microfilárias presentes em alguns dos sangues analisados pela técnica de Knott modificada	76
Figura 28 – Microfilárias coradas com a técnica das fosfatases ácidas	77
Figura 29 – Prevalências de <i>D. immitis</i> nos distritos estudados	78
Figura 30 – Gel de agarose com amostras positivas para <i>Dirofilaria immitis</i> , em cães microfilarémicos	82
Figura 31 – Gel de agarose com amostras negativas para <i>Dirofilaria immitis</i> , em cães não microfilarémicos.	83
Figura 32 – Gel de agarose com amostras positivas para <i>Wolbachia pipientis</i>	83

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de hospedeiros vertebrados de <i>Dirofilaria immitis</i>	14
Tabela 2 – Lista de espécies de mosquitos naturalmente infectados com <i>D. immitis</i>	16
Tabela 3 – Características morfológicas de microfilárias que é possível encontrar em cães e gatos	27
Tabela 4 – Diferenças observadas em algumas microfilárias coradas pelo método histoquímico das fosfatases ácidas	28
Tabela 5 – Lista de hospedeiros vertebrados de <i>Dirofilaria repens</i>	36
Tabela 6 – Lista de hospedeiros invertebrados de <i>Dirofilaria repens</i>	37
Tabela 7 – Alguns países com relatos de casos humanos de dirofilariose	47
Tabela 8 – Diferenças observadas em algumas microfilárias coradas pelo método histoquímico das fosfatases ácidas	61
Tabela 9 – Prevalência de cães infectados nos três distritos estudados, de acordo com o grupo etário.....	79
Tabela 10 – Prevalência de cães infectados nos três distritos estudados, de acordo com sexo.....	79
Tabela 11 – Prevalência de cães infectados nos três distritos estudados, de acordo com a pelagem	80
Tabela 12 – Prevalência de alterações cardíacas nos cães infectados nos três distritos estudados	80
Tabela 13 – Prevalência de lesões cutâneas e dimensões dos linfonodos nos cães infectados, nos três distritos estudados.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

A. - *Acanthocheilonema*

ADN - Ácido desoxirribonucleico

Cox1- Gene citocromo c oxidase subunidade 1

CTAB - Cetyltrimethylammonium bromide

D. - *Dirofilaria*

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ESCCAP - European Scientific Counsel Companion Animal Parasites

FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia

FMV - Faculdade de Medicina Veterinária

ftsZ - gene Filamenting temperature-sensitive mutante

IC - Intervalo de Confiança

IgG - Imunoglobulina G

IHMT - Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Km² - Quilómetros quadrados

Knott - Técnica de Knott

L1 - Primeiro estadio larvar

L2 - Segundo estadio larvar

L3 - Terceiro estadio larvar

L4 - Quarto estadio larvar

L5 - Quinto estadio larvar (Adulto imaturos)

M - Molar

mg - Miligrama

ml - Mililitro

mm - Milímetro

mM - Milimolar

mRNA – RNA mensageiro

MV - Médico Veterinário

NaCl - Cloreto de Sódio

N.D. - Não descrito

NaOH - Hidróxido de sódio

PAMPs - Pathogen-associated molecular patterns

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

p.b. - pares de base

rpm - Rotações por minuto

TAE - Tris-Acetato-EDTA

TE - Tris-EDTA

Th1 - Resposta imunitária celular Th1

Th2 - Resposta imunitária humoral Th2

U - Unidades de Taq-Polimerase

UTL - Universidade Técnica de Lisboa

WSP - *Wolbachia surface protein*

Witness – Teste rápido de detecção de antígenos circunates (*Witness*[®] *Dirofilaria*)

♀ - Fêmea

xg - Força centrífuga

°C - Grau centígrado

♂ - Macho

μm – Micrómetro

μM - Micrómolar

μl - Micrólitro

% - Percentagem

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Introdução

Actualmente, são conhecidos cerca de 1500 agentes infecciosos para o Homem, dos quais cerca de 66 são protozoários e 287 são helmintas. Olhando apenas para estes números é possível constatar a importância das doenças parasitárias para o ser humano (Torgerson & Macpherson, 2011).

A nível mundial, tem-se assistido nos últimos anos a uma crescente expansão das doenças transmitidas por artrópodes. Essa expansão é em muito influenciada pelas alterações climáticas, o crescimento do comércio internacional, o aumento nos movimentos populacionais e de animais e ainda, pelo crescente aumento da resistência a fármacos e insecticidas existentes em agentes patogénicos e respectivos vectores (Otranto *et al.*, 2009a).

Os avanços verificados actualmente, a nível de técnicas de diagnóstico, permitiram reconhecer a importância para a Saúde Pública de muitas infecções zoonóticas, que antigamente eram menosprezadas. Presentemente, estas doenças representam a maioria das doenças emergentes (60,3%), o que lhes confere uma grande relevância a nível mundial (Torgerson & Macpherson, 2011).

Mundialmente, existem vários relatos de infecção de seres humanos com filárias de animais, também denominadas como filárias zoonóticas. Apesar de existirem várias filárias que causam patologia em aves, répteis e anfíbios, até à data apenas filárias que parasitam outros mamíferos foram responsáveis por infecções zoonóticas. Este tipo de infecção ocorre em grande medida devido aos vectores com apetência zooantropofílica, e ao facto destes realizarem refeições sanguíneas em animais com infecções patentes, e também em seres humanos, transmitindo desta forma o parasita (Orihel & Eberhard, 1998). As filárias zoonóticas comumente encontradas a parasitar o ser humano, pertencem ao género *Dirofilaria* (Orihel & Eberhard, 1998). Um grande número de espécies de dirofilárias, incluindo *Dirofilaria immitis*, *D. repens*, *D. roemeri*, *D. tenuis*, *D. ursi*, *D. striata*, *D. subdermata*, *D. magnilarvatum* e *D. corynodes* pode parasitar o homem, sendo este apenas hospedeiro acidental (Torgerson & Macpherson, 2011).

Apesar dos esforços existentes para prevenir e controlar a dirofilariose em regiões endémicas, esta está a aumentar e a expandir-se para regiões onde antigamente não tinha sido descrita (Simón *et al.*, 2009).

Infecções humanas por *Dirofilaria* são esporádicas e a maioria é assintomática. No entanto, existem casos relatados de dirofilariose humana nos Estados Unidos da América e no Japão, com manifestações clínicas a nível pulmonar, e na Europa com manifestações essencialmente a nível subcutâneo e ocular.

Os custos associados a esta patologia são relativos e prendem-se essencialmente, com o diagnóstico diferencial que necessariamente se tem de realizar. Este diagnóstico nem sempre é fácil e requer o uso de técnicas imagiológicas e de detecção ADN do parasita em biópsias (Torgerson & Macpherson, 2011).

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Nematoda: Género *Dirofilaria* Railliet & Henry, 1911

Filo Nematoda

Classe Secernentea

Ordem Spirurida

Subordem Spirurina

Superfamília Filarioidea

Família Onchocercidae Leiper, 1911

Subfamília Dirofilarinae Sandground, 1921

Género *Dirofilaria* Railliet & Henry, 1911

(Classificação sistemática segundo Anderson, 2000)

Desde a criação do género *Dirofilaria* por Railliet e Henry (1911), várias foram as espécies descritas para este género e diversas foram as alterações sistemáticas a que foram sujeitas (Trotti *et al.*, 1997).

Alguns autores, dividem o género *Dirofilaria* em dois subgéneros. O subgénero *Dirofilaria*, que inclui a espécie *D. immitis*, e o subgénero *Nochtiella*, que inclui a espécie *D. repens* (Trotti *et al.*, 1997; Manfredi *et al.*, 2007). No cômputo geral, o subgénero *Dirofilaria* possui 5 espécies válidas (*D. ailure*, *D. freitasi*, *D. immitis*, *D. lutrae*, *D. spectans*) e 7 de validade questionável. O subgénero *Nochtiella* apresenta consideravelmente mais espécies, com 22 espécies validadas (*D. acutiuscula*, *D. bonnei*, *D. cancrivori*, *D. corynodes*, *D. genettae*, *D. granulosa*, *D. incrassata*, *D. linstowi*, *D. macacae*, *D. macrodemos*, *D. magnilarvatum*, *D. minor*, *D. pagumae*, *D. panamensis*, *D. repens*, *D. sachsii*, *D. striata*, *D. subdermata*, *D. sudanensis*, *D. tawila*, *D. tenuis*, *D. ursi*) e 8 espécies de validade questionável.

A nível morfológico existem várias características distintivas dos membros pertencentes a este género. Os adultos não apresentam lábios na boca, as papilas cefálicas são inconspícuas, a cutícula apresenta estriação transversal e o esófago encontra-se dividido em duas regiões, anterior e posterior, não distinguíveis. Existe ainda, um marcado dimorfismo sexual com os machos a apresentarem a parte posterior em espiral, papilas caudais numerosas e duas espículas diferentes. As fêmeas, apresentam a extremidade posterior arredondada, vulva após o esófago e são ovovivíparas, embora alguns autores considerem que são vivíparas, pois eliminam as

microfilárias directamente para a corrente sanguínea uma vez que a parede dos ovos se quebra facilmente (Dunn, 1978; Trotti *et al*, 1997).

As formas imaturas, microfilárias, não apresentam bainha e a extremidade posterior é afilada (Trotti *et al*, 1997).

Ao nível dos subgéneros, existem algumas particularidades morfológicas que nos permitem distinguir os elementos pertencentes a cada um. Os vermes adultos, que pertencem ao subgénero *Dirofilaria* são relativamente grandes, não apresentam cristas cuticulares, excepto na parte ventral da extremidade posterior dos machos e, as papilas da zona posterior dos machos são ligeiramente assimétricas em número e distribuição. Por sua vez, os nemátodes pertencentes ao subgénero *Nochtiella* são mais pequenos, apresentam cristas cuticulares longitudinalmente e, as papilas da zona posterior dos machos apresentam uma distinta assimetria em número e distribuição (Trotti *et al*, 1997; Manfredi *et al.*, 2007).

Na sua maioria, os vermes adultos pertencentes a este tipo de nemátodes parasitam o tecido subcutâneo do hospedeiro definitivo, a única excepção ocorre com *Dirofilaria immitis*, que parasita o sistema cardiovascular do seu hospedeiro (canídeos domésticos) (Anderson, 2000).

Um aspecto importante das espécies deste género, prende-se com a existência de um hospedeiro intermediário artrópode, que na maioria dos casos é um mosquito (Diptera: Culicidae). A única excepção é *D. ursi* que apresenta simulídeos (Diptera: Simuliidae) como hospedeiros intermediários/vectores (Anderson, 2000).

2.2- *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856)

2.2.1-Taxonomia

Filo Nematoda

Classe Secernentea

Ordem Spirurida

Subordem Spirurina

Superfamília Filarioidea

Família Onchocercidae

Subfamília Dirofilariinae

Dirofilaria immitis (Leidy, 1856), agente etiológico de dirofilariose (Reifur *et al.*, 2001) é uma espécie de nemátode que pertence à ordem Spiruridae, família Onchocercidae e à subfamília Dirofilariinae (Anderson, 2000).

Este nemátode foi descrito pela primeira vez em 1850, pelo médico americano J. Leidy, e nomeado como *Filaria canis cordis*. Seis anos depois, foi renomeado pelo mesmo autor como *Filaria immitis*. Uns anos mais tarde (1911), Railliet e Henry estabelecem *Dirofilaria* como género e usam *F. immitis* como espécie tipo (Lok, 1988).

Este nemátode filiforme conhecido na literatura anglo-saxónica, como *heartworm* (Ferasin & Knight, 2005; Shearer, 2011) e, na literatura lusófona como verme do coração (da Silva & Langoni, 2009), pertence actualmente ao género *Dirofilaria* (Anderson, 2000).

2.2.2 - Morfologia

Dirofilaria immitis é um nemátode alongado, esbranquiçado, filiforme, com a extremidade anterior do corpo arredondada (Figura 1) e, apresenta um dimorfismo sexual acentuado (Leite *et al.*, 2006; Furtado *et al.* 2010).



Figura 1 - Vermes adultos de *Dirofilaria immitis* (♀ e ♂) (Fotografia Original do Autor)

A superfície cuticular do corpo exhibe uma ligeira estriação transversal, com excepção da extremidade cefálica e posterior onde esta é aleatória. Junto ao ânus, na abertura da vulva e nos deirídeos¹, a estriação é completamente ausente.

A abertura bucal encontra-se numa posição terminal e apresenta uma conformação circular, não possui lábios, e é circundada por quatro pares de papilas cefálicas e dois pares de anfídeos² laterais (Furtado *et al.*, 2010).

O esófago encontra-se dividido em duas zonas, uma muscular e outra glandular, não existindo uma distinção clara entre ambas (Manfredi *et al.*, 2007; Furtado *et al.*, 2010).

O ânus encontra-se numa posição subterminal, com a abertura anal encurvada em direcção à extremidade posterior (Furtado *et al.*, 2010).

Os vermes adultos machos apresentam uma cauda espiralada, possuem um comprimento que pode variar entre os 120-200 mm e uma largura entre os 0.7-0.9 mm (Lok, 1988). A abertura da cloaca encontra-se próxima da extremidade posterior e ostenta duas espículas distintas em forma e tamanho. Não possuem gubernáculo³ (Lok, 1988; Manfredi *et al.*, 2007; Furtado *et al.* 2010).

As fêmeas medem entre 250-310 mm e têm de largura 1-1.3 mm apresentando a extremidade caudal arredondada (Lok, 1988). A vulva encontra-se próxima da extremidade anterior e é rodeada de lábios pouco proeminentes (Furtado *et al.*, 2010).

¹ Par de órgãos sensoriais, localizados lateralmente na região cervical (Anderson *et al.*, 2009)

² Par de órgãos sensoriais, localizados lateralmente na região cefálica (Anderson *et al.*, 2009)

³ Peça copuladora acessória do macho (Anderson *et al.*, 2009)

Este nemátode ovovivíparo emite as formas imaturas (microfilárias), que podem ser encontradas em circulação no hospedeiro vertebrado. As microfilárias (Figura 2) têm entre 290-330 µm de comprimento e 5-7 µm de largura, não possuem bainha e a extremidade posterior é afilada (Manfredi *et al.*, 2007).

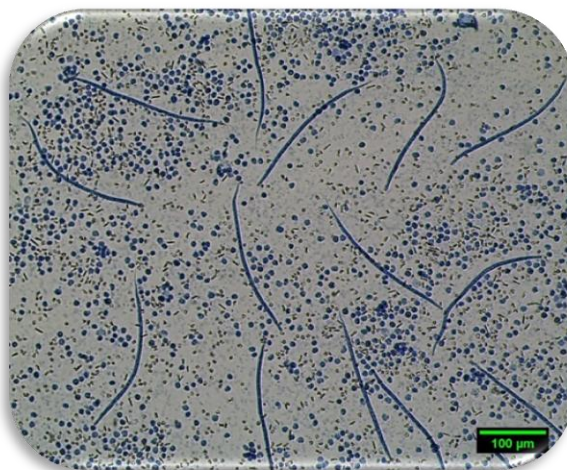


Figura 2 - Microfilárias de *Dirofilaria immitis*, observadas na técnica de Knott modificada - 100x (Fotografia Original do Autor)

2.2.3 – Ciclo Biológico

A transmissão desde nemátode, que tipicamente parasita as artérias pulmonares e ventrículo direito do hospedeiro definitivo (Leite *et al.*, 2006; Hoch & Strickland, 2008; Shearer, 2011) engloba obrigatoriamente dois hospedeiros: um definitivo, regra geral o canídeo doméstico e um intermediário, o mosquito (Diptera: Culicidae) (Reifur *et al.*, 2001).

O ciclo de vida de *Dirofilaria immitis* (Figura 3) inicia-se com a refeição sanguínea de uma fêmea de mosquito, num hospedeiro vertebrado infectado e consequente ingestão de microfilárias (pré-larvas L1) (Schrey & Trautvetter, 1998; Hoch & Strickland, 2008; Shearer, 2011). Uma vez no interior do mosquito, as microfilárias evoluem para L1, permanecem 24-36 horas no intestino médio e, findo este período, migram para as células dos túbulos de Malpighi (Leite *et al.*, 2006; McCall *et al.*, 2008).

Por volta do quinto dia após a infecção, ocorre nas microfilárias a diferenciação do sistema digestivo com a formação do esfago, intestino e recto. Sensivelmente, 6-7

dias após a infecção, as larvas (L1) deixam as células dos túbulos de Malpighi e entram no lúmen do mesmo (McCall *et al.*, 2008).

Até atingirem um estadio infectante (L3), as microfilárias sofrem duas mudas (Reifur *et al.*, 2001; Leite *et al.*, 2006). A primeira muda (L1 → L2) acontece 8-10 dias após a infecção inicial, e a segunda muda (L2 → L3) cerca de 2-3 dias após a primeira (McCall *et al.*, 2008).

O desenvolvimento das larvas no interior do mosquito está directamente relacionado com as condições ambientais existentes, nomeadamente a temperatura. O desenvolvimento até ao terceiro estadio ocorre em cerca de 13 dias, para temperaturas de 26°C (Shearer, 2011). Com outras condições ambientais, o tempo até existir a formação de larvas L3 pode oscilar entre 10-30 dias (Reifur *et al.*, 2001). Existe no entanto, um limiar (14 °C) abaixo do qual existe uma interrupção total do desenvolvimento larvar (Ferasin & Knight, 2005; Hoch & Strickland, 2008; Shearer, 2011).

Cerca de 17 dias após a refeição sanguínea, as larvas (L3) deixam os túbulos de Malpighi e migram através do hemocélio até às peças bucais do mosquito (Shearer, 2011).

No momento de uma nova refeição sanguínea por parte do mosquito, dá-se a infecção de um novo hospedeiro susceptível (Manfredi *et al.*, 2007). A saída das larvas L3 das peças bucais do mosquito é estimulada pela temperatura, que juntamente com hemolinfa são depositadas na pele do hospedeiro vertebrado (Ledesma & Harrington, 2011). Posteriormente, a larva penetra pelo orifício criado pelo mosquito durante a refeição sanguínea e migra activamente até ao tecido subcutâneo ou muscular (Hoch & Strickland, 2008; Shearer, 2011). A larva continua a sua migração e desenvolvimento, atingindo a fase L4 num período de 3-12 dias após a infecção. A muda final (L4 → L5), surge após a migração até à região abdominal e torácica do hospedeiro, nos 50-70 dias após a infecção inicial do hospedeiro definitivo (Shearer, 2011). Nesta fase, os vermes adultos ainda imaturos (L5) entram no sistema vascular e migram até ao coração e artérias pulmonares, onde maturam (Hoch & Strickland, 2008). Os vermes adultos tornam-se sexualmente maduros, 120 dias após a infecção, sucedendo posteriormente a cópula, a fecundação e a consequente produção de microfilárias.

A detecção de microfilárias na corrente sanguínea pode verificar-se 6 meses após a infecção inicial, mas mais frequentemente surge 7-9 meses após a infecção (McCall *et al.*, 2008; Shearer, 2011). A concentração de microfilárias no sangue periférico dos hospedeiros apresenta uma oscilação ao longo do dia. O número máximo de microfilárias no sangue periférico pode ser detectado ao fim da tarde e ao longo da noite, no entanto, podem ser detectadas microfilárias (5-20%) ao longo das 24 horas. Esta oscilação na microfilarémia, também apresenta um carácter sazonal, sendo a primavera e o verão os períodos em que existem um maior número de microfilárias em circulação. As oscilações verificadas diária e sazonalmente na microfilarémia são designadas como periodicidade e podem ser explicadas pela adaptação do ciclo-biológico dos filarídeos à presença e características dos seus vectores (Bowman & Atkins, 2009).

O tempo de vida dos vermes adultos é de cerca de 5-7 anos e das microfilárias é de 30 meses (Hoch & Strickland, 2008; Shearer, 2011).

D. immitis pode também realizar o seu ciclo biológico em gatos, no entanto, existem algumas diferenças, pois estes revelam-se menos susceptíveis à infecção (Reifur *et al.*, 2001).

Os gatos, apresentam menor carga parasitária que os cães, com uma média de 1-6 vermes adultos, resultado da elevada mortalidade de microfilárias, (Reifur *et al.*, 2001; Shearer, 2011), substancialmente menos que os 1-250 vermes que podem ser encontrados em cães (Reifur *et al.*, 2001). A própria esperança de vida dos vermes adultos é menor nos gatos, cerca de 2-4 anos (Shearer, 2011). Outra particularidade, prende-se com o facto de os gatos poderem ser considerados hospedeiros finais de dirofilariose, uma vez que apenas 20% dos gatos infectados são microfilarémicos, impedindo assim que o ciclo se perpetue (Reifur, 2001; Shearer, 2011). Nos gatos, devido a uma maior dificuldade dos vermes em atingir a maturidade, o período pré-patente é regra geral de sete a nove meses (Bowman & Atkins, 2009; Shearer, 2011).

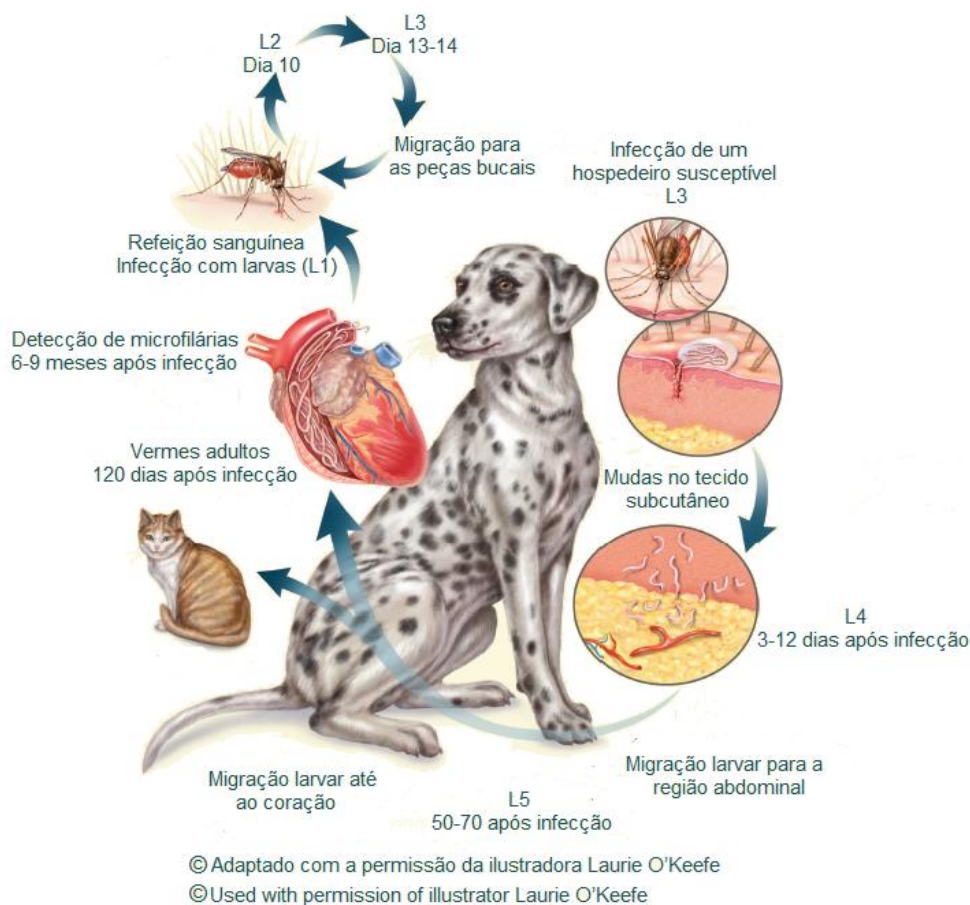


Figura 3 - Ciclo de vida de *Dirofilaria immitis* em cães e gatos (Fonte: Boss & Shearer, 2011)

2.2.4 - Epidemiologia

2.2.4a - Hospedeiros vertebrados

Existem relatos da presença deste nemátode parasita em vários hospedeiros, tanto em animais domésticos como animais selvagens (Tabela 1).

Os vermes adultos de *Dirofilaria immitis* já foram encontrados num grande número de espécies de mamíferos, sendo que, a maioria desses relatos resultam de achados *post-mortem* (Lok, 1988).

O cão revela-se o hospedeiro definitivo preferencial de *D. immitis*, no entanto, já foram descritos como hospedeiros os seguintes mamíferos: lobos, coiotes, raposas, dingos, gatos, pinípedes (focas e leões marinhos), mustelídeos, ursos, pandas, coelhos,

cavalos, veados, castores, primatas não humanos e humanos (Lok, 1988; Manfredi *et al.*, 2007; Hoch & Strickland, 2008). Leite e colaboradores (2006) indicam ainda, a existência deste parasita em guaxinins, leões e tigres.

Na última década, foi ainda descrita pela primeira vez uma ave (pinguim-de-Humboldt), de um zoo do Japão, parasitada por *D. immitis* (Sano *et al.*, 2005)

À excepção do cão a maioria das infecções nos outros hospedeiros é esporádica e a microfilarémia ausente (Reifur, 2001; Manfredi *et al.*, 2007)

Tabela 1 – Lista de hospedeiros vertebrados de *Dirofilaria immitis* (adaptado de: Lok, 1988; Trotti *et al.*, 1997; McCall *et al.*, 2008; Bowman & Atkins, 2009; Sano *et al.*, 2005)

Espécies	Espécies	Espécies
<i>Ailurus fulgens</i>	<i>Gulo gulo</i>	<i>Panthera tigris</i>
<i>Canis aureus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Phoca vitulina</i>
<i>Canis dingo</i>	<i>Hylobates lar</i>	<i>Pongo pygmaeus</i>
<i>Canis latrans</i>	<i>Leopardus pardalis</i>	<i>Procyon lotor</i>
<i>Canis lupus</i>	<i>Lutra sp.</i>	<i>Pteronura brasiliensis</i>
<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Lycaon pictus</i>	<i>Spheniscus humboldti</i>
<i>Canis rufus</i>	<i>Macaca mulatta</i>	<i>Uncia uncia</i>
<i>Castor canadensis</i>	<i>Mustela putorius</i>	<i>Urocyon cinereoargenteus</i>
<i>Cervus nippon</i>	<i>Nasua nasua</i>	<i>Ursus americanus</i>
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	<i>Neofelis nebulosa</i>	<i>Vulpes bengalensis</i>
<i>Cuon alpinus</i>	<i>Nyctereutes procyonoides</i>	<i>Vulpes pallipa</i>
<i>Equus caballus</i>	<i>Ondatra zibethica</i>	<i>Vulpes vulpes</i>
<i>Felis catus</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	<i>Zalophus californianus</i>
<i>Felis concolor</i>	<i>Panthera leo</i>	
<i>Felis yagouaroundi</i>	<i>Panthera onça</i>	

2.2.4b - Hospedeiros invertebrados

Estudos iniciados por Grassi e Noè (1900), demonstraram que os mosquitos (Diptera: Culicidae) são responsáveis pela transmissão da maioria das espécies do género *Dirofilaria* (Cancrini & Gabrielli, 2007).

A família Culicidae apresenta cerca de 3450 espécies e subespécies e tem uma distribuição quase mundial. Podemos encontrar exemplares nas regiões tropicais, temperadas e ainda na região ártica, verificando-se contudo, a ausência de elementos desta família em algumas ilhas e na região antártica (Service, 1993).

Actualmente, mais de 70 espécies de mosquitos foram descritas como sendo capazes de hospedar o desenvolvimento completo de microfilárias de *Dirofilaria immitis*, até um estadio infectante (L3) (Leite *et al.*, 2006; McCall *et al.*, 2008).

Ao contrário de outros agentes etiológicos, nomeadamente, os que provocam a malária (*Plasmodium* spp.), onde o desenvolvimento apenas sucede em mosquitos do género *Anopheles*. O desenvolvimento de *D. immitis* pode ocorrer em vários géneros de culicídeos, tais como *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Mansonia*, *Coquillettidia*, *Ochlerotatus* e *Psorophora* (Serrão, 2004; Gouveia, 2007; Leite *et al.*, 2006; Bowman & Atkins, 2009).

Os estudos publicados relativos à capacidade vectorial das várias espécies de mosquitos para a transmissão de *D. immitis*, tanto incluem observações em mosquitos capturados da natureza como em colónias mantidas em laboratório (Ledesma & Harrington, 2011).

Experimentalmente, algumas espécies e estirpes de mosquitos são susceptíveis e permitem o desenvolvimento de larvas de *D. immitis* até à fase infectante. No entanto, nem todas as espécies e estirpes que se mostram laboratorialmente susceptíveis à infecção, são bons vectores em condições naturais (Serrão, 2004; Ledesma & Harrington, 2011).

Várias espécies de mosquitos distribuídos pelo mundo foram estudadas e identificadas naturalmente infectadas com *D. immitis* (Tabela 2) (Serrão, 2004; Gouveia, 2007; Bowman & Atkins, 2009; da Silva & Langoni, 2009)

Em Portugal, um dos primeiros estudos sobre vectores de filarioses animais, permitiu identificar na região da Comporta, duas fêmeas de *Culex theileri* parasitadas com microfilárias de uma espécie de *Dirofilaria*, muito provavelmente *D. immitis* (Ribeiro *et al.* 1983).

Mais recentemente na região autónoma da Madeira foi realizado um estudo que permitiu identificar *Culex theileri* como provável responsável pela transmissão de *D. immitis* na região (Gouveia, 2007).

Tabela 2 – Lista de espécies de mosquitos naturalmente infectados com *D. immitis* (adaptado de: Serrão, 2004; Gouveia, 2007; Bowman & Atkins, 2009; da Silva & Langoni, 2009; Otranto *et al.* 2009b; Ledesma & Harrington, 2011)

Espécies	Espécies
<i>Aedes aegypti</i>	<i>Cx. Torrentium</i>
<i>Ae. Albopictus</i>	<i>Cx. Tritaeniorhynchus</i>
<i>Ae. Cinereus</i>	<i>Cx. modestus</i>
<i>Ae. Detritus</i>	<i>Mansonia uniformis</i>
<i>Ae. Geniculatus</i>	<i>Ochlerotatus alboannulatus</i>
<i>Ae. Polynesiensis</i>	<i>Oc. Canadensis</i>
<i>Ae. Pseudoscutellaris</i>	<i>Oc. Cantator</i>
<i>Ae. Punctor</i>	<i>Oc. Excrucians</i>
<i>Ae. Vexans</i>	<i>Oc. Fijiensis</i>
<i>Anopheles annulipes</i>	<i>Oc. Notoscriptus</i>
<i>An. Bradleyi</i>	<i>Oc. Rubrithorax</i>
<i>An. Crucians</i>	<i>Oc. Samoanus</i>
<i>An. Freeborni</i>	<i>Oc. Scapularis</i>
<i>An. Maculipennis</i>	<i>Oc. Sierrensis</i>
<i>An. Punctipennis</i>	<i>Oc. Sollicitans</i>
<i>An. Quadrimaculatus</i>	<i>Oc. Stictitus</i>
<i>Coquillettidia richiardii</i>	<i>Oc. Stimulans</i>
<i>Culex annulirostris</i>	<i>Oc. Taeniorhynchus</i>
<i>Cx. Australicus</i>	<i>Oc. Togo</i>
<i>Cx. Declarator</i>	<i>Oc. Triseriatus</i>
<i>Cx. Fatigans</i>	<i>Oc. Trivittatus</i>
<i>Cx. Nigripalpus</i>	<i>Oc. Vigilax</i>
<i>Cx. Papiens</i>	<i>Psorophora columbae</i>
<i>Cx. Quinquefasciatus</i>	<i>Ps. Ferox</i>
<i>Cx. Salinarius</i>	<i>Wyeomyia bourrouli</i>
<i>Cx. Saltanensis</i>	

2.2.4c - Distribuição geográfica

A dirofilariose apresenta-se como uma doença com distribuição global, mas as áreas endémicas encontram-se em climas onde as populações de vectores são elevadas e estáveis. Climas mais frios, mas que possuam verões quentes, lagos, rios ou terras irrigadas são susceptíveis de permitir o desenvolvimento dos vectores e consequentemente pode haver focos da doença.

Varias áreas endémicas para *Dirofilaria immitis* têm sido relatadas mundialmente e vão desde a Europa, Ásia, Africa, Austrália, América do Sul, Estados Unidos da América e Canadá (Nematollahi & Barazandeh, 2010).

Europa

A dirofilariose canina e felina está distribuída essencialmente, nos países mais a sul, tais como Portugal, Espanha, sul de França, Itália e Grécia (Figura 4). Existem também, relatos de infecções dispersas pela Turquia e países orientais da Europa (Genchi *et al*, 2005).

A primeira descrição existente desta doença foi realizada há 400 anos atrás, quando Birago (1640) identificou um cão do norte de Itália com vermes adultos no coração (Genchi *et al*, 2005, Lee *et al.*, 2010).

Em Itália, encontra-se a maior das áreas endémica da Europa, localizada ao longo do rio Pó, a norte do país (Genchi *et al*, 2005). Nessa região endémica, a prevalência de *D. immitis* em cães é entre 20-80% e nos gatos ronda os 20% (Traversa *et al.*, 2010a; Otranto & Dantas-Torres, 2010). Nos últimos 20 anos, verificou-se um aumento na prevalência desta doença na área endémica e começou a ser detectada fora dessa mesma área. A dispersão da dirofilariose para áreas previamente livres desta, faz com que actualmente seja possível detectá-la em todo o país. A região central de Itália que até ao ano 2000 era considerada não endémica, apresenta-se actualmente como uma região com transmissão de *D. immitis* (Traversa *et al.*, 2010a).

Dois estudos realizados na região central revelaram prevalências em cães, de 13% (2003) e 2.3% (2010) (Piergili-Fioretti *et al.*, 2003; Traversa *et al.*, 2010a). Em 2010, o mesmo estudo foi também efectuado em gatos e revelou uma prevalência de 0.3% (Traversa *et al.*, 2010a). Novos focos detectados a sul, mostram a presença da doença em áreas onde esta era ausente, com prevalências de 0.5% (Otranto & Dantas-Torres, 2010).

Em Espanha, outro país com dirofilariose, a situação epidemiológica não é totalmente conhecida devido à falta de estudos em algumas regiões (Montoya-Alonso *et al.*, 2010). No entanto, do que se conhece, Espanha apresenta as maiores prevalências da zoonose a sul do país e nas ilhas Canárias (Montoya *et al.*, 1998). Já no norte do país,

existem relatos recentes da ocorrência da doença, o que demonstra que a falta de conhecimento da situação nessa zona não se deve à falta de transmissão, mas sim, de estudos que permitam avaliar a situação (Montoya-Alonso *et al.*, 2010). Do que se conhece sobre a dirofilariose neste país, o local com maior prevalência é sem dúvida as ilhas Canárias, onde estudos realizados em três anos consecutivos (1994-1996) obtiveram uma prevalência média de 58.89% (Montoya *et al.*, 1998). A nível continental, em locais como o País Basco e as Astúrias não existe qualquer relato da zoonose em animais e locais como Salamanca e Huelva, apresentam uma prevalência de 30% e 36,7%, respectivamente (Montoya *et al.*, 2007).

A detecção de *D. immitis* em França ocorre principalmente no sul do país, incluindo a ilha da Córsega. Dois estudos serológicos realizados nos últimos anos a cães neste país, demonstram a existência de uma prevalência de 0,22% a 6,87% (Pantchev *et al.*, 2009a).

Na Grécia, um estudo na região norte do país, analisou serologicamente 341 amostras, sendo que 61 apresentaram resultados positivos (17.9%). Na mesma região, anos antes a prevalência registada em dois estudos variou entre de 10% e 34% (Lefkaditis *et al.*, 2010).

Outros países europeus como a Sérvia (6,2%) (Traversa *et al.*, 2010b), Turquia (0,2-30%) (Yildirim *et al.*, 2011), e a Bulgária (65%) (Lefkaditis *et al.*, 2010) também relatam prevalências significativas desta parasitose.

No nosso país um estudo epidemiológico dos anos 1990 divulga a existência de cães microfilarémicos em quase todas as regiões, desde a Madeira (30%), Ribatejo (16.7%), Alentejo (16.5%), Algarve (12%), no entanto, neste caso não foi realizado o diagnóstico diferencial, não sendo possível afirmar a prevalência exacta de *D. immitis* (Pereira da Fonseca *et al.*, 1991). Existem também, estudos realizados no concelho de Setúbal (2002) e no concelho de Coimbra (2007) onde se obtiveram prevalências de 37,5% (Gomes, 2002) e de 13 % (Sousa *et al.*, 2008), respectivamente. Mais recentemente, na zona de Setúbal, um estudo realizado em gatos também permitiu observar uma prevalência de 1,2 % (Almeida, 2010).

Um estudo serológico publicado ainda este ano apresenta, a prevalência de *Dirofilaria immitis*, a nível nacional, em cães que não apresentavam sinais clínicos compatíveis com alguma doença transmitida por vectores e em cães com suspeita de

sofrerem uma doença vectorial, as prevalências encontradas foram 3,6% e 8,9% respectivamente. (Cardoso *et al.*, 2012)

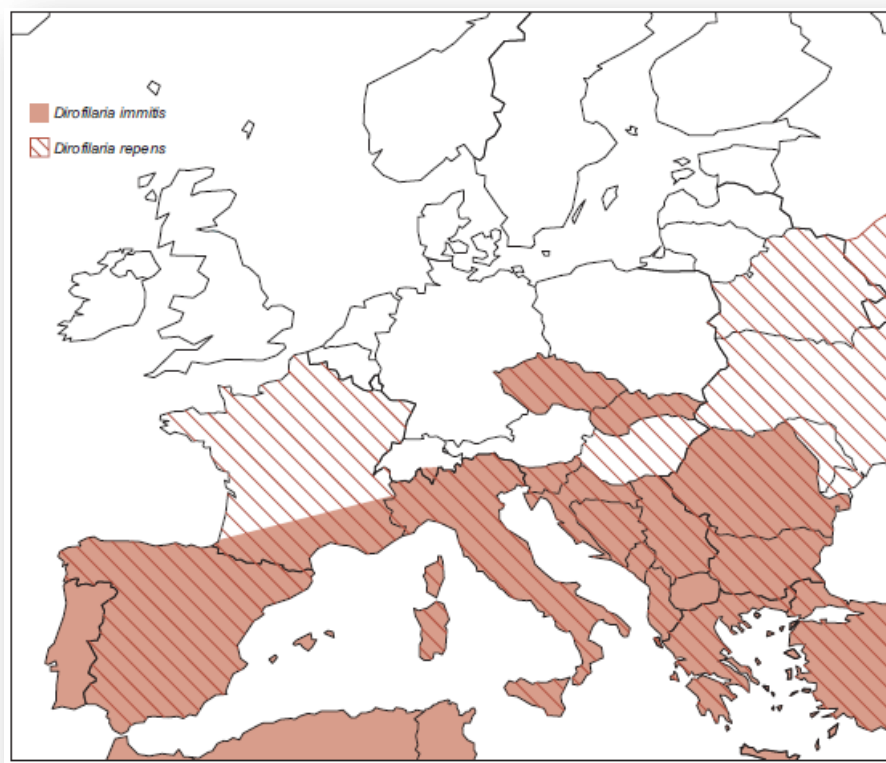


Figura 4 – Distribuição aproximada das zonas endémicas de *D. immitis* e *D. repens* na Europa (Fonte: ESCCAP, 2009)

América do Norte

Nos últimos 50 anos, a distribuição desta espécie deixou de estar confinada aos estados a sudeste e passou a ser endémica na quase totalidade dos Estados Unidos da América. Essa alteração demográfica ocorreu em grande parte devido ao transporte de cães entre os vários estados. Existem outros aspectos, que também podem ter contribuído para a rápida disseminação da doença, entre eles podemos destacar o retrocesso dos programas de controlo de mosquitos, bem como, a existência e disseminação de um outro bom reservatório como é o caso do coiote (*Canis latrans*) (Bowman & Atkins, 2009).

Nos Estados Unidos da América, cães com dirofilariose já foram diagnosticados nos 50 estados que constituem o país (McCall *et al.*, 2008; Shearer, 2011). Apesar disso, a doença é considerada endémica em apenas 49 dos estados, uma vez que o Alasca não tem a sua situação epidemiológica bem esclarecida (McCall *et al.*, 2008).

Territorialmente, os estados que se encontram a sudeste, apresentam uma maior prevalência, com a doença a ser detectada com maior frequência na bacia do rio Mississippi (McCall *et al.*, 2008).

Um estudo nacional efectuado em 48 estados revelou que, a maioria dos estados apresentam aproximadamente 1% de prevalência de dirofilariose canina. No entanto, os estados que constituem a região sudeste foram os que apresentaram a maior média nacional com uma prevalência registada de 3,9% (Bowman *et al.*, 2009).

Também no Canadá, foi realizado um estudo nacional com base em testes serológicos e, nesse estudo a prevalência registada desta doença foi de 0,22%, resultado que os autores afirmam estar de acordo com estudos anteriores e inalterado nos últimos 20 anos (Villeneuve *et al.*, 2011).

América do Sul

Apesar de algumas descrições iniciais de animais parasitados, terem sido realizados nesta zona do mundo, nomeadamente no Brasil, a verdade é que comparativamente à Europa e à América do Norte, pouco se sabe da situação epidemiológica deste parasita nos países da América do Sul (Vezzani *et al.*, 2011). Dos 17 países da América do Sul apenas 4 possuem registos de prevalência da infecção (Labarthe & Guerrero, 2005).

No Brasil existe a presença de *D. immitis* na totalidade do território. A prevalência de dirofilariose varia bastante, no entanto, em regiões hiperendémicas pode atingir os 60%. Um dos últimos trabalhos epidemiológicos realizados demonstra que a prevalência nacional desceu de 7,2% em 1988 para 2 % em 2001 (Dantas-Torres, 2008).

Outro país sul-americano afectado por este parasita é a Argentina, onde a prevalência nacional varia entre os 3,5% e os 12,7%. Apesar da prevalência nacional, existem províncias na capital, Buenos Aires, onde a prevalência pode atingir os 23,5%.

Os outros dois países com prevalência conhecida nesta zona do planeta são o Peru (4,35%) e a Colômbia (3,8 – 4,8%) (Labarthe & Guerrero, 2005).

Ásia

Baseado num número limitado de estudos existentes, é consensual que a distribuição de *D. immitis* na Índia está restringida à região nordeste e a algumas regiões do centro. Um estudo recente mostra a prevalência de algumas cidades do norte do país como Delhi (4,3%) e Sikkim (1%), e uma prevalência global de 6,7% (Rani *et al.*, 2010).

A falta de conhecimento desta parasitose no Irão, foi o motivo de um estudo realizado em 2009 em algumas províncias do norte do país, sendo a prevalência registada foi de 25,5% (Malmasi *et al.*, 2011).

No Japão, a dirofilariose é uma das principais doenças parasitárias, havendo registo de prevalência de 50% em Tóquio e de 41% em Osaka. A nível felino neste país, a prevalência também é considerável, com valores que variam de 0,5% a 9,5% em gatos errantes e de 3% e a 5,2% em gatos domésticos (Roncalli *et al.*, 1998).

Na China, um dos maiores países desta região, casos de infecção por *D. immitis* em animais selvagens de zoo já tinham sido relatados. Apesar disso, só recentemente foi descrita a sua existência em cães de uma cidade chinesa, Dandong, onde os autores obtiveram uma prevalência de 16,6%, utilizando como método de diagnóstico a microscopia e de 24% usando PCR (Hou *et al.*, 2011).

2.2.5 – Fisiopatologia

Apesar do nome comum dado a este parasita (verme de coração), sugerir que a patologia causada por *Dirofilaria immitis* é especialmente cardíaca, esse facto não se verifica (Venco, 2007a). As lesões provocadas pela infecção com este parasita ocorrem essencialmente, nas artérias pulmonares e parênquima pulmonar, e o grau das lesões está relacionado com a carga parasitária, a duração da infecção e a reacção do hospedeiro à infecção (Hoch & Strickland, 2008). O papel das microfilárias na patologia não é de tanto relevo, no entanto nalguns casos extremos pode ocorrer hipersensibilidade cutânea às formas imaturas e nos casos mais extremos glomerulonefrites (Grandi *et al.*, 2007; McCall *et al.*, 2008).

Migrações ectópicas raras podem aparecer nomeadamente, no cérebro, olhos, testículos ou aorta, sucedendo mais em felinos domésticos (McCall *et al.*, 2008; ESCCAP, 2009).

A evolução clínica da dirofilariose é crónica e muitos dos cães infectados não apresentam qualquer sintomatologia (ESCCAP, 2009).

A dirofilariose encontra-se associada a muitas alterações fisiopatológicas, as mais relevantes baseiam-se nas alterações anatómicas provocadas pela presença dos vermes nas artérias (Bowman & Atkins, 2009). As alterações são consequência da libertação de substâncias tóxicas pelos vermes, reacção imunológica do hospedeiro a essas mesmas substâncias e à própria acção mecânica dos vermes (Hoch & Strickland, 2008). Infecções massivas e duradouras podem levar à estenose, tromboembolismo e consequentemente alteração do fluxo sanguíneo e hipertensão pulmonar (Shearer, 2011). Em resultado da hipertensão pulmonar, pode ocorrer uma acção compensatória do ventrículo direito e consequente diminuição da parede ventricular (Hoch & Strickland, 2008). A hipertensão pulmonar crónica sem tratamento, progride invariavelmente para um quadro de insuficiência cardíaca congestiva (Grandi *et al.*, 2007).

Os danos no parênquima pulmonar, também podem suceder, e são particularmente graves em felinos domésticos, resultam da reacção imunológica provocada pela morte dos vermes adultos ou microfilárias (Hoch & Strickland, 2008; Shearer, 2011).

A manifestação mais grave da dirofilariose, é o Síndrome da Veia Cava que acontece em 75-90% dos canídeos domésticos machos. A causa desta síndrome é a movimentação de um grande número de vermes das artérias pulmonares para o ventrículo direito ou veia cava posterior, resultando na obstrução da circulação sanguínea e interferindo com o funcionamento da válvula tricúspide (Hoch & Strickland, 2008; Bowman & Atkins, 2009). Sem tratamento esta síndrome provoca a falência cardíaca e consequente morte (Hoch & Strickland, 2008).

Infecções crónicas com *D. immitis* podem também ter como resultado glomerulonefrite e proteinúria como resultado da deposição de complexos antígeno-anticorpo (Hoch & Strickland, 2008).

Nos felinos domésticos, na maioria dos casos, as infecções são assintomáticas, mesmo quando se desenvolve um processo de “auto-cura” (ESCCAP, 2009; Shearer, 2011). No entanto, a importância clínica da dirofilariose felina é elevada uma vez que, a existência de cargas parasitárias baixas não impede que os casos possam ser igualmente fatais (American Heartworm Society, 2012a). A maioria dos vermes adultos não sobrevive depois da sua migração até às artérias pulmonares, no entanto, mesmo depois de mortos os parasitas podem ter consequências graves para o hospedeiro, desencadeando a denominada “Doença Respiratória Associada à Dirofilariose”. A morte dos vermes, promove uma forte resposta inflamatória no parênquima e veias pulmonares, com consequente colapso circulatório. Outras consequências desta patologia, podem incluir alterações neurológicas ou mesmo a morte súbita (Bowman & Atkins, 2009; Shearer, 2011).

2.2.6 - Diagnóstico

Os testes de diagnóstico para rastreio de uma possível dirofilariose canina ou felina, só fazem sentido se existir na história clínica do animal, a premência ou a deslocação para uma zona endémica que lhe permita estar exposto à infecção (Ferasin & Knight, 2005).

O painel de testes disponível para a detecção de dirofilariose, varia desde testes de detecção de microfílias em circulação, testes serológicos para a detecção de

antigénios ou de anticorpos circulantes e ainda, métodos moleculares como *polymerase chain reaction* (PCR), que permitem diferenciar com precisão as várias espécies de filárias que podem parasitar cães e gatos (Genchi *et al.*, 2007; Shearer, 2011).

A diferenciação morfológica ou molecular das espécies de microfilárias que podem ser encontradas em circulação é de particular relevância, uma vez que existem filárias que não têm as consequências patogénicas de *D. immitis* para o hospedeiro como por exemplo *Acanthocheilonema reconditum* (McCall *et al.*, 2008; American Heartworm Society, 2012).

Existem ainda exames complementares, como a radiografia e o ecocardiograma que permitem obter evidência da infecção quando a suspeita clínica é elevada, mas os outros meios de diagnóstico são inconclusivos (Shearer, 2011).

2.2.6a - Detecção de microfilárias em circulação

Exame a fresco

Para a realização desta técnica, o material necessário é bastante simples e encontra-se disponível em qualquer laboratório (Serrano *et al.*, 2010).

Uma gota de sangue colhido num animal com suspeita de dirofilariose é colocada numa lâmina e posteriormente coberta com uma lamela (no caso de ser impossível a análise imediata, o sangue colhido deve ser colocado num tubo com anticoagulante até ao seu processamento). A confirmação da presença de microfilárias é efectuada ao microscópio óptico, onde se tenta observar os movimentos realizados por estas no sangue (Genchi *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2010).

Um diagnóstico negativo por esta técnica, não deve ser considerado definitivo, uma vez que este método é pouco sensível, devendo-se recorrer a outros métodos mais fiáveis (Serrano *et al.*, 2010).

As vantagens deste método são essencialmente a rapidez e facilidade com que se realiza, mas por outro lado, a pouca sensibilidade, a existência de muitos falsos negativos e a impossibilidade de se fazer distinção de espécies de microfilárias, faz com que não seja uma técnica muito usada (Genchi *et al.*, 2007).

Métodos de concentração

Estes métodos permitem a diferenciação das várias espécies de microfilárias, através de características morfológicas.

As microfilárias podem ser concentradas pelo método de Knott ou com a utilização de filtros (Genchi *et al.*, 2007; ESCCAP, 2009).

No entanto, estes testes apesar de mais sensíveis que a observação directa de sangue no microscópio, têm como grande desvantagem o facto de até 20-30% de cães parasitados não apresentarem microfilárias e, apenas 20% dos gatos serem microfilarémicos (Schrey & Trautvetter, 1998; McCall *et al.*, 2008; ESCCAP, 2009; Shearer, 2011). Outro aspecto importante prende-se com o diagnóstico diferencial, que nem sempre é fácil devido à semelhança das características utilizadas para a identificação, das diferentes espécies de filárias que podem parasitar os canídeos domésticos (Genchi *et al.*, 2007; ESCCAP, 2009). Por estes motivos e apesar da maior sensibilidade, um teste negativo não é suficiente para excluir uma infecção (ESCCAP, 2009).

Ao nível destes testes, outro facto a ter em conta é a da inexistência de qualquer relação directa entre a carga parasitária e o número de microfilárias observados nas técnicas de concentração, pois na realidade, os cães com maior microfilarémia normalmente estão parasitados com poucos vermes adultos (Genchi *et al.*, 2007; ESCCAP, 2009).

Técnica Knott modificado

É um dos métodos de concentração que pode ser utilizado para a detecção e diferenciação das espécies de filárias que parasitam os cães e os gatos (Genchi *et al.*, 2007). Este teste permite a diferenciação morfológica das espécies de filárias, sendo particularmente útil na diferenciação de *D. immitis* e outras filárias não patogénicas como é o caso de *Acanthocheilonema reconditum* (Tabela 3) (American Heartworm Society, 2012).

Para a realização deste teste utiliza-se 1 ml de sangue, ao qual é adicionado 9 ml de formol a 2% num tubo de centrifugação. De seguida, a mistura é centrifugada a 1500 rpm durante 5-8 minutos (Genchi *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2010). O sobrenadante

resultante da centrifugação é eliminado, e é adicionada uma gota de azul de metileno ao sedimento (Serrano *et al.*, 2010). Algumas gotas do sedimento corado são colocadas numa lâmina que é posteriormente coberta com uma lamela, para observação ao microscópio (Figura 5 e 6) (Genchi *et al.*, 2007).

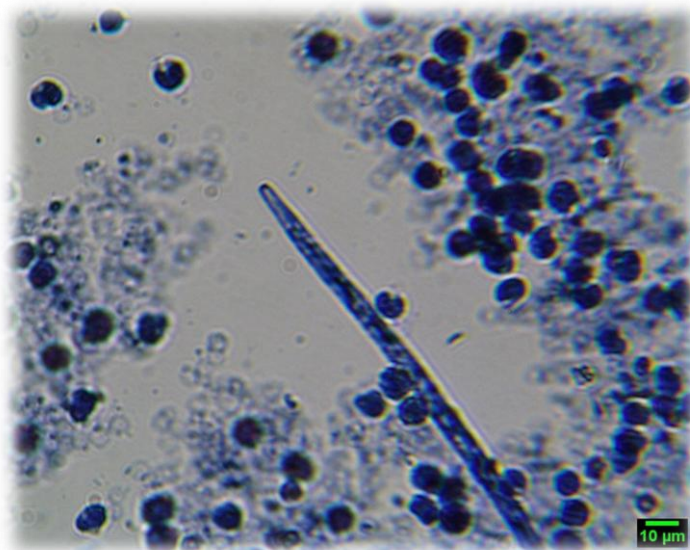


Figura 5 – Extremidade anterior de uma microfilária (*D. immitis*) observada na técnica de Knott modificada – 400x (Fotografia Original do Autor)

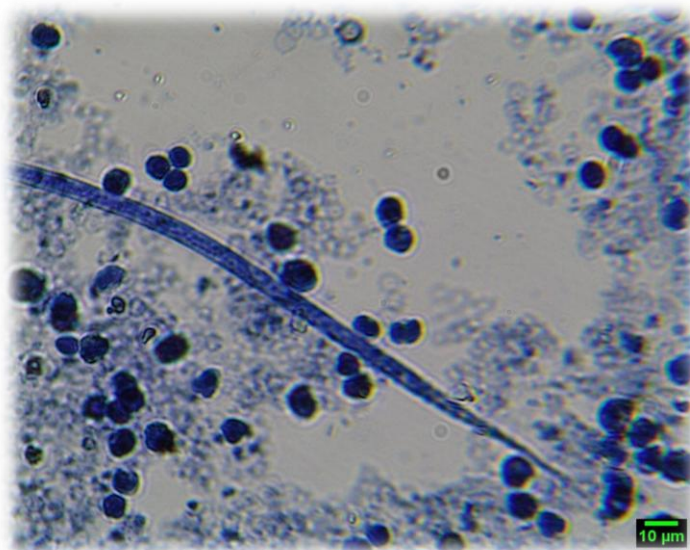


Figura 6 – Extremidade posterior de uma microfilária (*D. immitis*) observada na técnica de Knott modificada – 400x (Fotografia Original do Autor)

Tabela 3 – Características morfológicas de microfilárias que é possível encontrar em cães e gatos
(Adaptado de: McCall *et al.*, 2008)

Espécie	Comprimento	Largura	Características
<i>Dirofilaria immitis</i>	290-330µm	5-7µm	Sem bainha, extremidade cefálica e posterior afiladas
<i>Dirofilaria repens</i>	300-360µm	6-8µm	Sem bainha, extremidade cefálica obtusa e extremidade posterior curvada em forma de gancho
<i>Acanthocheilonema reconditum</i>	260-283µm	4µm	Sem bainha, extremidade cefálica obtusa e com um gancho cefálico, extremidade posterior curvada em forma de gancho
<i>Acanthocheilonema dracunculoides</i>	190-247µm	4-6.5µm	Com bainha, extremidade cefálica obtusa, extremidade posterior afilada

Teste de filtração

Este é outro dos testes que permite a diferenciação das microfilárias através das suas características morfológicas (Tabela 4) (Genchi *et al.*, 2007).

Para a realização deste teste, adiciona-se a 1 ml de sangue a testar, cerca de 9 ml de solução de lise, como por exemplo formol a 2% (Serrano *et al.*, 2010). De seguida, a mistura é filtrada, o filtro (5µm de diâmetro) é retirado e corado para posterior observação ao microscópio (Genchi *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2010).

Quer este método quer o anteriormente descrito, nem sempre permitem com facilidade a diferenciação das várias espécies de microfilárias existentes, havendo para isso outros métodos mais fiáveis, nomeadamente o abaixo indicado (Serrano *et al.*, 2010).

Coloração histoquímica – Fosfatase ácida

Para um correcto diagnóstico diferencial entre as espécies de microfilárias que podem ser encontradas em circulação nos canídeos domésticos, umas das técnicas que

pode ser empregue, tem como base a distribuição da actividade somática das fosfatases ácidas (Tabela 4) (Figura 7) (Madeira de Carvalho, 1994).

Para a execução desta técnica, é realizado um esfregaço de sangue que posteriormente é fixado com acetona absoluta (Madeira de Carvalho, 1994; Genchi *et al.*, 2007). Esta técnica que será descrita em pormenor no capítulo de Material e Métodos, usa como substrato o Naftol AS-TR fosfato e como cromógeno a Pararosnilina (Figura 7) (Peribáñez *et al.*, 2001). Apesar da sua utilidade no diagnóstico diferencial (Madeira de Carvalho, 1994), a grande desvantagem desta técnica prende-se com o curto período de tempo em que os reagentes podem ser armazenados, como por exemplo o Naftol AS-TR fosfato, que tem o período de utilização de 1 mês e a Pararosnilina tem seis meses para ser utilizada (Peribáñez *et al.*, 2001).

No entanto, Peribáñez e colaboradores descreveram a utilização de um *kit* comercial como alternativa que demonstrou ter resultados semelhantes ao método manual. As grandes vantagens da sua utilização prendem-se com o menor número de reagentes necessários e com o maior tempo de armazenamento que estes possuem (Peribáñez *et al.*, 2001; Genchi *et al.*, 2007).

Tabela 4 – Diferenças observadas em algumas microfilárias coradas pelo método histoquímico das fosfatases ácidas (Adaptado de: Genchi *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2010)

Espécie	Características
<i>Dirofilaria immitis</i>	Dois locais de actividade das fosfatases ácidas: uma no poro anal outra no poro excretor
<i>Dirofilaria repens</i>	Um local de actividade das fosfatases ácidas: poro anal
<i>Acanthocheilonema reconditum</i>	Apresenta actividade das fosfatases ácidas pela totalidade do corpo
<i>Acanthocheilonema dracunculoides</i>	Apresenta actividade intensa das fosfatases ácidas no poro anal e corpo central, e fraca na região cefálica

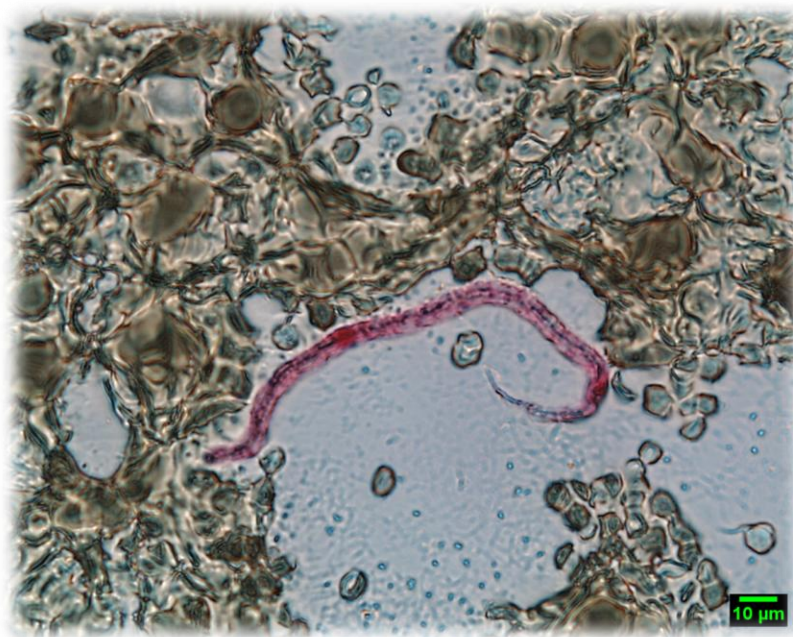


Figura 7 – Microfilária (*D. immitis*) corada com a técnica das fosfatases ácidas onde é possível observar os locais de actividade no poro anal e poro excretor – 400x (Fotografia Original do Autor)

2.2.6b - Testes serológicos

Detecção de anticorpos

Este tipo de teste, detecta os anticorpos produzidos pelo sistema imunitário do hospedeiro vertebrado, quando este está exposto ao parasita (Shearer, 2011).

A detecção de anticorpos é útil para apurar possíveis infecções passadas e não para verificar uma infecção activa. Por esse facto, são testes usados numa perspectiva de excluir infecções e não confirmá-las. A utilização destes testes não é habitual em cães, devido à sua baixa especificidade e à existência de métodos mais fidedignos como é o caso dos testes para a detecção de antígenos (Ferasin & Knight, 2005).

Em gatos estes testes são usados uma vez que permitem a detecção de uma exposição a vermes adultos (machos ou fêmeas) ou microfilárias, com a vantagem de detectarem anticorpos produzidos nos 2 primeiros meses após a infecção. No entanto, a interpretação dos resultados é complicada, uma vez que resultados positivos podem ser obtidos em situações de infecções activas ou até de infecções controladas, em que o

próprio sistema imunitário consegue controlar a infecção (Genchi *et al.*, 2007). Tipicamente usados em gatos, estes testes têm uma especificidade que varia entre os 81-89% e uma sensibilidade de 62-72% (Shearer, 2011).

Detecção de antigénios

Outra alternativa às já mencionadas anteriormente, é a detecção de antigénios específicos produzidos pelo aparelho reprodutor das fêmeas de *D. immitis*, recorrendo a *kits* comerciais de testes imunocromatográficos (Figura 8) e de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) (Ferasin & Knight, 2005). A maioria dos testes é muito específica e sensível, não existindo reacções cruzadas com outras filárias que podem ser encontradas a parasitar os canídeos domésticos (Ferasin & Knight, 2005; ESCCAP, 2009).

A obtenção de resultados fiáveis e reprodutíveis, está dependente de um correcto manuseamento destes *kits*, de acordo com os fabricantes. A utilização dos testes em condições de campo, está também muito dependente das condições de armazenamento e manuseamento dos *kits* e das próprias amostras analisadas (American Heartworm Society, 2012b).

Alguns testes ELISA são desenhados de forma a quantificar a carga parasitária, uma vez que existe alguma correlação entre a quantidade de antigénios circulante e o número de fêmeas existentes. No entanto, resultados incorrectos podem acontecer em consequência da morte dos parasitas, o que promove um aumento dos antigénios circulantes (Hoch & Strickland, 2008; American Heartworm Society, 2012).

Embora exista elevada sensibilidade nestes testes, falsos negativos podem acontecer, como resultado do exame ser efectuado antes do término do período pré-patente (6-9 meses), existirem infecções só por machos ou infecções com baixa carga parasitária (ESCCAP, 2009).

As características destes testes, fazem com que sejam especialmente úteis nos casos de infecções ocultas, ou seja, sem microfilárias em circulação (Ranjbar-Bahadori *et al.*, 2007; American Heartworm Society, 2012). Estes testes podem ainda ser utilizados com a vertente de averiguar a terapêutica usada, uma vez que o desaparecimento dos antigénios da circulação sanguínea é rápido (Genchi *et al.*, 2007).



Figura 8 – Teste rápido de detecção de antígenos específicos de fêmeas de *Dirofilaria immitis* - **WITNESS®*Dirofilaria*** - Direita: teste positivo; Esquerda: teste negativo (Fotografias Originais do Autor)

2.2.6c - Métodos Moleculares

O desenvolvimento da biologia molecular tem fornecido a muitas áreas das ciências biomédicas, novas ferramentas que permitem avanços significativos nos conhecimentos básicos.

Perceber a relação parasita-hospedeiro é de extrema relevância para o desenvolvimento da parasitologia veterinária. O uso de métodos moleculares na parasitologia veterinária é bastante útil, proporcionando novas abordagens ao estudo da relação entre parasita e hospedeiro (Prichard, 1997).

Apesar dos esforços, que tem sido feitos desde 1977 para a utilização de testes baseados no reconhecimento de ADN de parasitas, nomeadamente, para a sua detecção e identificação, a verdade é que poucos são os testes que estão disponíveis, e muitos destes são apenas usados ocasionalmente no diagnóstico de parasitoses (Hunt, 2011).

No caso particular da dirofilariose, tem havido a tentativa de utilizar métodos moleculares como forma de discriminação de várias filárias que infectam os canídeos, mas também, como ferramenta de detecção de potenciais vectores (Watts *et al.*, 1999; Casiraghi *et al.*, 2006; Genchi *et al.*, 2007).

O diagnóstico parasitológico da dirofilariose canina baseia-se essencialmente, na identificação microscópica de microfilárias, este facto pode ser especialmente difícil

quando várias filárias existem em simpatria. Deste modo, o desenvolvimento de métodos moleculares pode revelar-se de grande utilidade no diagnóstico mais preciso desta parasitose (Latrofa *et al.*, 2012).

2.2.6d - Métodos complementares

Radiografia

Este método por si só não permite o diagnóstico de dirofilariose, mas é útil na avaliação das alterações cardio-pulmonares e da própria gravidade da doença (Hoch & Strickland, 2008).

As alterações radiográficas comuns nos casos de dirofilariose canina incluem aumento do ventrículo direito, da artéria pulmonar e ainda alterações ao nível do parênquima pulmonar (Bowman & Atkins, 2009). Casos graves de infecção podem ainda provocar cardiomegalia (ESCCAP, 2009).

Na dirofilariose felina as alterações verificadas são semelhantes, se bem que menos frequentes (Nelson, 2008; Shearer, 2011).

Ecocardiografia

A sensibilidade desta técnica para o diagnóstico de dirofilariose canina e felina, está muito dependente das capacidades técnicas de quem a efectua, e da carga parasitária (Nelson, 2008; Shearer, 2011).

Se bem realizada, esta técnica, permite a visualização dos vermes no ventrículo direito, na veia cava posterior e nas artérias pulmonares (Bowman & Atkins, 2009; ESCCAP, 2009).

2.3 - *Dirofilaria repens* Railliet and Henry, 1911

2.3.1 - Taxonomia

Filo Nematoda

Classe Secernentea

Ordem Spirurida

Subordem Spirurina

Superfamília Filarioidea

Família Onchocercidae

Subfamília Dirofilariinae

Juntamente, com todos os outros membros do género *Dirofilaria*, a espécie *Dirofilaria repens* é o agente etiológico de dirofilariose (da Silva & Langoni, 2009).

Amato Lusitano, médico português, é provavelmente o responsável pelo primeiro relato de um ser humano parasitado por *D. repens*, facto que teve lugar no sul de França, em 1566. Dois séculos depois (1855), um oftalmologista italiano removeu um parasita que se localizava na pálpebra de um paciente. Nessa altura, o parasita foi e denominado de *Filaria conjunctivae*, devido à sua localização no paciente. A denominação então adoptada fruto de uma nova análise do parasita foi anos mais tarde abandonada, em favor da actualmente utilizada. (Orihel & Eberhard, 1998; Tarello, 2011).

A nível veterinário, a primeira descrição de *Dirofilaria repens* em cães, foi realizada por Bonvicini em 1910. Railliet e Henry, um ano mais tarde em França, viriam a classificar este tipo de nemátode, com a denominação utilizada correntemente (Tarello, 2011).

Novos relatos deste parasita só foram feitos vários anos depois (1953), em Paris quando vários parasitas foram identificados no tecido subcutâneo de nove cães (Tarello, 2011).

2.3.2 – Morfologia

Esta espécie de nemátode, apresenta vermes adultos de menores dimensões que a espécie anteriormente abordada. O corpo apresenta uma cutícula esbranquiçada, com estriações longitudinais bem marcadas. Os vermes adultos apresentam diferença de tamanho de acordo com o sexo, sendo as fêmeas de maiores dimensões, podendo atingir os 100-170 mm de comprimento e os 4,6-6,5 mm de diâmetro; os machos por sua vez, são mais pequenos e variam dos 50-70 mm de comprimento e os 3,7-4,5 mm de diâmetro.

Morfológicamente, outros aspectos permitem fazer a distinção sexual dos vermes adultos desta espécie. A parte terminal dos machos termina curvada para a região ventral, e tal como os machos de *Dirofilaria immitis* apresentam um par de espículas de dimensões diferentes. As fêmeas ovovivíparas, apresentam a vulva próxima da extremidade anterior e cercada por lábios, e a região posterior é ligeiramente curvada para a região ventral, tal como nos machos.

As formas imaturas produzidas pelas fêmeas (microfilárias) que se encontram na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado, não possuem bainha e possuem a extremidade posterior em forma de chapéu-de-chuva. Podem atingir os 300-360 µm de comprimento e os 6-8 µm de largura (Manfredi *et al.*, 2007; Tasic *et al.*, 2007).

2.3.3 – Ciclo Biológico

O ciclo de vida de *Dirofilaria repens* (Figura 9), tal como o de *Dirofilaria immitis* tem 5 estadios larvares, que se desenvolvem entre o hospedeiro vertebrado e o hospedeiro intermediário/vector (Diptera: Culicidae) (Venco, 2007b).

O início do ciclo, começa com a ingestão de microfilárias (L1) pelas fêmeas de mosquito, quando estas realizam a refeição sanguínea num hospedeiro vertebrado com microfilarémia. Após a ingestão das larvas L1, estas migram para os túbulos de Malpighi, 36 horas após a sua entrada no hospedeiro intermediário. O desenvolvimento do parasita até um estadio infectante ocorre nos túbulos de Malpighi, onde este passa por duas mudas (L1→L2→L3). A duração até atingir essa fase varia consoante a espécie de mosquito e temperatura ambiental (10 dias a 24°C; 21 dias a 27°C). Após

esta fase, ocorre a migração das larvas L3 para a cabeça e peças bucais, aí permanecem até uma nova refeição sanguínea por parte do mosquito (Manfredi *et al*, 2007; Tasic *et al.*, 2007).

A infecção de um novo hospedeiro acontece quando o mosquito infectado e infectante realiza uma nova refeição sanguínea. Nessa altura, as larvas L3 são depositadas na pele juntamente com a hemolinfa e migram até ao orifício criado por este. Após penetrarem pelo orifício, as larvas migram até ao tecido subcutâneo (Venco, 2007b). No tecido subcutâneo e adiposo do hospedeiro, as larvas passam por mais duas mudas até atingirem a fase adulta, num período que pode variar entre os 85-120 dias (Tasic *et al.*, 2007). Os vermes adultos podem viver nos tecidos subcutâneos entre 2 a 4 anos (Tarello, 2011).

O período pré-patente deste parasita é grande e pode ir dos 6 aos 9 meses, após a infecção. A detecção de microfilárias no sangue periférico dos hospedeiros vertebrados, pode ser efectuada em qualquer altura do dia, uma vez que estas não apresentam qualquer periodicidade, sendo por isso consideradas aperiódicas (Manfredi *et al*, 2007).

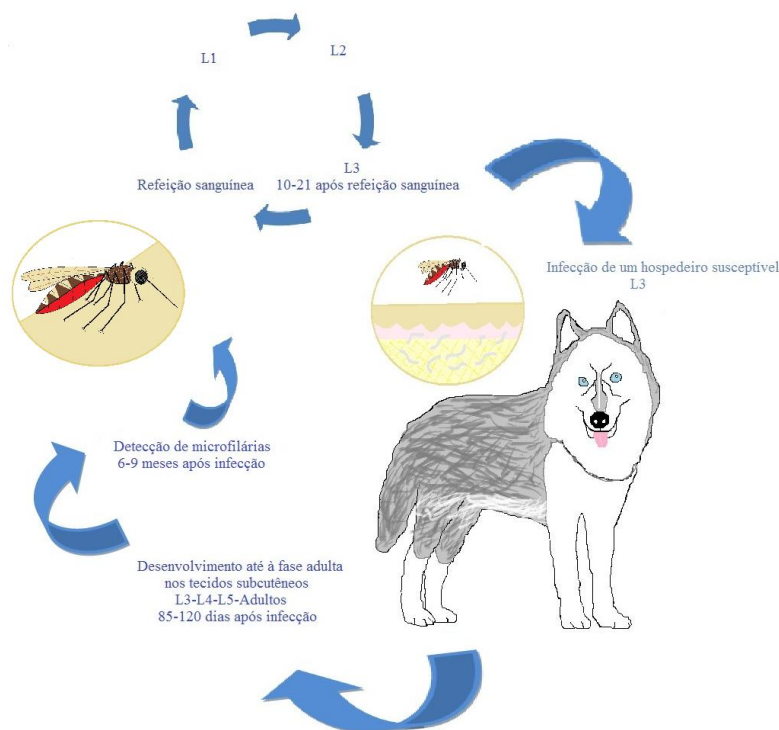


Figura 9 – Ciclo de vida *Dirofilaria repens* (Original do Autor)

2.3.4 - Epidemiologia

2.3.4a - Hospedeiros vertebrados

Os nemátodes pertencentes a esta espécie de filária têm como hospedeiros definitivos habituais o cão, o gato assim como outros carnívoros selvagens (Tabela 5) (Venco, 2007b; Tasic *et al.*, 2007; Tarello, 2011).

Esporadicamente, o ser humano pode acidentalmente ser parasitado por *Dirofilaria repens* (Venco, 2007b; Tarello, 2011)

Tabela 5 – Lista de hospedeiros vertebrados de *Dirofilaria repens* (Adaptado de: Trotti *et al.*, 1997)

Espécies
<i>Canis aureus</i>
<i>C. azarae</i>
<i>C. lupus familiaris</i>
<i>C. lupus</i>
<i>Felis catus</i>
<i>F. viverrinus</i>
<i>Genetta tigrina</i>
<i>Homo sapiens</i>
<i>Lynx canadensis</i>
<i>Panthera leo</i>

2.3.4b - Hospedeiros invertebrados

O desenvolvimento desta espécie de filárias, até uma fase infectante para o hospedeiro vertebrado, ocorre como na maioria das espécies deste género, em insectos, nomeadamente mosquitos (Diptera: Culicidae) (Tabela 6) (Anderson, 2000; Cancrini & Gabrielli, 2007).

Vários géneros de mosquitos são conhecidos por permitirem o desenvolvimento em condições naturais de *Dirofilaria repens* até à fase larvar L3, nomeadamente, *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Armigeres*. Em condições laboratoriais, alguns insectos da família

Tabanidae também permitem o desenvolvimento desta espécie de filária (Manfredi *et al.*, 2007).

Tabela 6 – Lista de hospedeiros invertebrados de *Dirofilaria repens* (Adaptado de: Manfredi *et al.*, 2007; Otranto & Dantas-Torres, 2010; Tarello, 2011)

Espécies
<i>Aedes albopictus</i>
<i>Ae. Caspius</i>
<i>Ae. Vexans</i>
<i>Anopheles maculipennis</i>
<i>Culex modestus</i>
<i>Cx. Pipiens</i>

2.3.4c - Distribuição geográfica

A distribuição conhecida de *Dirofilaria repens* engloba regiões como a Europa, Ásia e África (Genchi *et al.*, 2011)

A patogenicidade para cães e gatos associada a uma infecção com *Dirofilaria repens* é considerada baixa, por essa razão os estudos sobre a distribuição desta filária são escassos (Scaramozzino *et al.*, 2005).

Os canídeos domésticos são os principais reservatórios de *D. repens* (Tarello, 2011).

Em locais como o Irão, Sri Lanka e Índia, é possível observar em algumas zonas prevalências de 61%, 60% e 6,7%, respectivamente (Rani *et al.*, 2010; Tarello, 2011). Em outros locais do globo, nomeadamente na união europeia, existem também relatos da presença de *D. repens* na população canina. Em países como a Bulgária (1%), Suíça (1,6%), Grécia (12-37%), Hungria (10-39%), Eslováquia (32%), República Checa (9%), Alemanha (6,8%), França (1,36%), Itália (30%) e Espanha (5.1-84.6%), os estudos já realizados mostram a prevalência deste parasita na população canina (Scaramozzino *et al.*, 2005; Pantchev *et al.*, 2009b; Genchi *et al.*, 2011).

A nível felino, é possível encontrar gatos microfilarémicos no sudeste asiático. Na Europa, no entanto, apenas em Itália foi possível identificar gatos microfilarémicos, sendo que um estudo realizado recentemente na região centro de Itália, obteve uma prevalência de 1,6% (Traversa *et al.*, 2010a; Tarello, 2011).

2.3.5 – Fisiopatologia

Pouco se conhece ainda, sobre a patologia associada às infecções por *Dirofilaria repens* (Grandi *et al.* 2007; Tarello, 2011).

Do pouco que se conhece, a principal e mais visível consequência para os animais parasitados, é o aparecimento de complicações cutâneas como: pápulas, alopecia localizada, eczema acompanhado com prurido e ocasionalmente, a presença de nódulos cutâneos, isto tudo devido à presença dos vermes adultos (Pampiglione & Rivasi, 2000; Grandi *et al.*, 2007; Tarello, 2011).

As raras manifestações clínicas apresentadas por alguns animais parasitados, são classificadas por alguns autores em duas síndromes clínicas. A primeira, sendo uma dermatite multifocal localizada principalmente na região facial. A segunda, caracterizada pelo aparecimento de pápulas pruriginosas, semelhantes às existentes num caso de sarna (Grandi *et al.*, 2007).

Esporadicamente, casos mais graves são relatados em animais com grande carga parasitária. Nestes casos, alterações histopatológicas foram verificadas em alguns órgãos como baço, fígado, pulmões, rins, coração e cérebro. Os mecanismos por detrás destas alterações não são conhecidos, em grande parte porque experimentalmente, ainda não se conseguiram reproduzir (Grandi *et al.*, 2007).

A localização dos vermes adultos na sua maioria restringe-se aos tecidos subcutâneos. No entanto, localizações ectópicas podem surgir, como por exemplo na conjuntiva (Grandi *et al.*, 2007).

Apesar das consequências que este nemátode pode trazer para o hospedeiro vertebrado, na maioria dos casos os animais parasitados não apresentam qualquer sinal clínico evidente (Tarello, 2011).

2.3.6 - Diagnóstico

O diagnóstico desta parasitose, que na sua maioria é assintomática, acontece maioritariamente por acidente. Muitas vezes, o diagnóstico é realizado em animais que são levados ao médico veterinário, com outros sinais clínicos não relacionados com a presença dos vermes adultos nos tecidos subcutâneos (Grandi *et al.*, 2007).

O diagnóstico desta parasitose é baseado essencialmente na presença de lesões cutâneas, na detecção de microfilárias no sangue periférico pela técnica de Knott modificado e por um teste serológico negativo para *Dirofilaria immitis* (Tarello, 2011). Além da detecção das microfilárias (Knott modificado), é necessário realizar a distinção entre as várias espécies que podem parasitar o cão, que pode ser feito como referido para a *D. immitis*, através da técnica de fosfatase ácida ou através de métodos de biologia molecular. A utilidade da realização do teste serológico para *D. immitis* prende-se com o facto de não existirem reacções cruzadas descritas entre as espécies, o que permite de algum modo excluir a presença dessa filária no caso do teste ser negativo (Grandi *et al.*, 2007; Tarello, 2011).

O diagnóstico etiológico das lesões cutâneas deve também ser realizado, nomeadamente, porque podem ter origem em ectoparasitas (Tarello, 2011).

3 – Associação entre *Wolbachia pipientis* e filárias

A descoberta desta espécie de bactéria *Wolbachia* data de há mais de 100 anos, quando Hertig e Wolbach (1924) a observaram pela primeira vez em células de mosquito (*Culex pipiens*). Doze anos mais tarde, a bactéria que é a única do seu género, foi classificada com *Wolbachia pipientis*, incluída actualmente na família Anaplasmataceae, ordem Rickettsiales e classe α -Proteobacteria (Merçot & Poinso, 2009).

Dois grupos distintos de invertebrados são conhecidos por hospedarem esta espécie de bactéria. O primeiro, onde a bactéria se encontra amplamente disseminada, com 20-76% de espécies infectadas, engloba os artrópodes terrestres. O segundo, onde esta se encontra mais restrita, abrange nemátodes parasitas da família Onchocercidae (Merçot & Poinso, 2009; Ferri *et al.*, 2011).

Na literatura mundial, muitas das referências que aparecem da bactéria, por vezes apenas inclui o nome do género (*Wolbachia*). Apesar de em termos taxonómicos ser incorrecto, é largamente utilizado em microbiologia onde muitas vezes é difícil a aplicação do conceito de espécie (Ferri *et al.*, 2011).

Várias análises filogenéticas têm sido efectuadas a este género de bactéria, que actualmente se encontra dividido em supergrupos, classificados de A a I (Bowman, 2011). Os vários supergrupos existentes, são associados consoante o tipo de hospedeiros onde se encontram (Martin & Gavotte, 2010; Ferri *et al.*, 2011). O grupo dos artrópodes terrestres é hospedeiro essencialmente dos supergrupos A, B, E, G, H, enquanto os nemátodes parasitas hospedam principalmente as bactérias dos supergrupos C, D e I. Apesar desta aparente separação, entre grupos que infectam artrópodes e os que infectam nemátodes, existe um supergrupo de *Wolbachia* (F), que pode ser encontrado em ambos os grupos de hospedeiros (Merçot & Poinot, 2009; Martin & Gavotte, 2010; Ferri *et al.*, 2011; Bowman, 2011).

Localizada na maioria dos tecidos dos artrópodes hospedeiros, esta bactéria tem um papel de parasita, manipulando a reprodução dos insectos de modo a assegurar a sua transmissão vertical para a descendência (Merçot & Poinot, 2009; Slatko *et al.*, 2010; Ferri *et al.*, 2011). Os mecanismos por detrás desta manipulação são vários e variam desde a partenogénese, feminização dos machos, morte dos machos e incompatibilidade citoplasmática (Slatko *et al.*, 2010).

Nos nemátodes, a presença desta bactéria parece estar limitada a duas subfamílias (Onchocercinae e Dirofilarinae) da família Onchocercidae, no entanto, nem todos os membros parecem apresentar esta bactéria (Casiraghi *et al.*, 2004; Slatko *et al.*, 2010).

Estudos de microscopia electrónica, iniciados nos anos 1970, mostraram a presença de *Wolbachia* em várias espécies de filárias. Actualmente, sabe-se que várias espécies de parasitas albergam esta bactéria, nomeadamente, *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*, *Onchocerca volvulus*, *Brugia malayi* e *Wuchereria bancrofti* (Bandi *et al.*, 2001; Casiraghi *et al.*, 2004).

A distribuição anatómica da *Wolbachia* nos vermes adultos está repartida por algum tecido somático, pelas cordas laterais, quer do macho quer da fêmea, e no aparelho reprodutor da fêmea (Bandi *et al.*, 2001; Merçot & Poinot, 2009; Ferri *et al.*, 2011). Também, as formas larvares presentes no mosquito apresentam associação com a bactéria (Bandi *et al.*, 2001).

A transmissão da bactéria no grupo de nemátodes, também é feita por via materna tal como nos artrópodes, mas neste caso não existe manipulação reprodutiva

(Bandi *et al.*, 2001; Slatko *et al.*, 2010), parecendo antes existir uma associação mutualista entre ambos. Estudos efectuados indicam que a presença da *Wolbachia* é necessária para a biosíntese de algumas moléculas essenciais, para a reprodução e para o desenvolvimento dos nemátodes (Ferri *et al.*, 2011).

Existem várias razões para se pensar que a presença da *Wolbachia* é essencial para a sobrevivência dos nemátodes que a albergam. Em primeiro lugar, existe uma prevalência de 100% nas espécies de nemátodes em que a bactéria já foi identificada. Em segundo, estudos filogenéticos indicam uma história co-evolutiva dos dois organismos, implicando uma dependência recíproca (Kramer, 2007; Slatko *et al.*, 2010). Este facto é ainda apoiado por estudos que permitem observar que a utilização de medicamentos, nomeadamente antibióticos, que tenham um efeito bactericida, tem também repercussões a nível das próprias filárias. Nas filárias os efeitos do tratamento com antibióticos variam desde inibição da embriogénese, infertilidade, inibição do desenvolvimento larvar e ainda, morte dos vermes adultos (Slatko *et al.*, 2010).

O reconhecimento da associação simbiótica entre *Wolbachia* e alguns nemátodes com importância médica e veterinária, e o facto das filárias que albergam a bactéria necessitarem desta durante pelo menos parte do seu ciclo de vida, permite tentar explorar uma nova área para o controlo destas filarioses (Bandi *et al.*, 2001; Slatko *et al.*, 2010).

3.1 – Papel da *Wolbachia* na patogénese e diagnóstico da Dirofilariose

O reconhecimento da presença de *Wolbachia* em várias filárias humanas e animais, levantou a questão do papel que esta poderia ter na patologia associada a estas filarioses (Simón *et al.*, 2007; McCall *et al.*, 2008).

No caso particular de dirofilariose, existem evidências que permitem assumir que o hospedeiro entra em contacto com *Wolbachia* quando este está infectado com *Dirofilaria immitis* ou *D. repens* (Simón *et al.*, 2007; Grandi *et al.*, 2008). O contacto do hospedeiro vertebrado com esta bactéria é constante, quer seja pela sua libertação pelo útero das fêmeas adultas, ou aquando da morte das filárias por causas naturais, por

acção do sistema imunitário do hospedeiro ou por acção de terapêutica (Frank & Heald, 2010).

Evidências directas da presença da bactéria em tecidos do hospedeiro (túbulos do fígado, células epiteliais glomerulares e pulmões), resultam de estudos realizados em cães e seres humanos, recorrendo a técnicas imunohistoquímicas. No entanto, a detecção de anticorpos específicos e mediadores inflamatórios em cães, gatos, murganhos e humanos também permite indirectamente tirar algumas conclusões (Simón *et al.*, 2007; McCall *et al.*, 2008).

Certamente que a *Wolbachia* desempenha um papel importante na patogénese da dirofilariose canina e felina, no entanto, o seu contributo específico ainda é desconhecido (Shearer, 2011).

O papel da *Wolbachia* na resposta montada pelo hospedeiro parece ser fruto da interacção entre as moléculas associadas à bactéria e o sistema imunológico do hospedeiro. Em humanos e modelos murinos infectados, a libertação da bactéria revelou-se associada com o aumento de citocinas pró-inflamatórias, recrutamento de neutrófilos e aumento de imunoglobulinas específicas. É sabido que o reconhecimento por parte dos receptores *Toll-like* do sistema imunitário de marcadores específicos, como os *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), promove a produção de espécies reactivas de oxigénio, citocinas pró-inflamatórias e a regulação de moléculas que estimulam uma resposta adaptativa. Um potencial marcador PAMPs desta espécie de bactéria, e dos mais estudados é o *Wolbachia surface protein* (WSP) (McCall *et al.*, 2008).

A presença da bactéria é responsável pela activação da resposta imune por parte dos hospedeiros, sendo possível a detecção de anticorpos IgG específicos contra WSP em cães, gatos e seres humanos infectados com *D. immitis* (Simón *et al.*, 2007, 2008).

Estudos conduzidos em cães e seres humanos, permitiram identificar que a resposta imune desenvolvida à libertação da bactéria é essencialmente celular (Th1), ainda em cães, foi possível observar que esta mesma proteína promove a produção de IL-8 que tem uma forte capacidade de recrutar neutrófilos (Simón *et al.*, 2007; McCall *et al.*, 2008; Martin & Gavotte, 2010). A análise da expressão de mRNA de citocinas e de anticorpos em cães naturalmente infectados, demonstrou igualmente que infecções com microfilarémia estão associadas a uma resposta Th2 direccionada contra antígenos

de *D. immitis*, enquanto a resposta Th1 contra *WSP* é predominante em cães amicrofilarémicos. Nos seres humanos por seu lado, é possível a observação de uma resposta Th1 predominante em indivíduos com patologia pulmonar, enquanto uma resposta Th2 está associada a indivíduos que não desenvolvem qualquer sintomatologia (Simón *et al.*, 2009).

Estudos experimentais realizados em gatos, permitiram verificar que os títulos de anticorpos anti-*WSP* produzidos aumentam após a aplicação de tratamento adulticida, implicando uma vez mais a bactéria na resposta imune montada pelo hospedeiro (McCall *et al.*, 2008; Shearer, 2011). Foi ainda, verificada uma resposta imunitária específica contra anticorpos de *Wolbachia* por parte de gatos infectados, antes da detecção de anticorpos contra *D. immitis* (McCall *et al.*, 2008).

Também em cães, se verifica que a patologia pulmonar e as lesões arteriais associadas à infecção com *D. immitis*, se revela menos severa em cães tratados com uma terapêutica combinada de doxiciclina e outro medicamento filaricida (Shearer, 2011, Kramer *et al.*, 2011).

Estes aspectos sugerem que a *Wolbachia* participa na resposta imune induzida pelo hospedeiro, mas também, permite especular que o papel principal da bactéria na patologia da doença, se deve essencialmente à resposta imune montada pelo hospedeiro quando os vermes morrem e a libertam, e não enquanto estes estão ainda vivos (McCall *et al.*, 2008; Shearer, 2011).

O uso por parte da comunidade médico-veterinária de antibióticos, nomeadamente doxiciclina, antes da aplicação do tratamento adulticida, de modo a reduzir a resposta imune nas infecções por *D. immitis*, tem-se revelado de grande utilidade (McCall *et al.*, 2011). Por este motivo, a determinação do período em que existe uma diminuição da infecção por *Wolbachia*, pode revelar-se de extrema utilidade no controlo dos efeitos adversos do tratamento da doença. Assim, o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico, para a detecção da bactéria, podem tornar-se de assinalável relevância, para a melhoria dos protocolos terapêuticos existentes, para a detecção de infecções pré-patentes e ocultas, ou ainda como mecanismo de avaliação da eficácia da terapêutica instituída (Simón *et al.*, 2007; Tiawsirisup *et al.*, 2010; Rossi *et al.*, 2011).

4 – Importância zoonótica de *Dirofilaria* spp.

Os principais agentes causais de filarioses zoonóticas, podem ser encontrados no género *Dirofilaria*, e dentro do género, duas espécies adquirem especial relevo, nomeadamente *Dirofilaria (Dirofilaria) immitis* com uma distribuição cosmopolita e *Dirofilaria (Nochitella) repens* apenas presente no Velho Mundo (Orihel & Eberhard, 1998; Simón *et al.*, 2009). Para além dessa duas espécies, outras ainda que mais raramente já foram assinaladas a parasitar o ser humano, designadamente: *D. (D.) spectans*; *D. (N.) magnilarvatum*; *D. (N.) striata* *D. (N.) tenuis*; *D. (N.) ursi*; *D. (N.)* (Trotti *et al.*, 1997).

O primeiro relato de uma infecção humana por *D. immitis* aconteceu no Brasil em 1887, quando dois vermes foram recuperados do ventrículo direito de uma criança (Lee *et al.*, 2010). Cerca de 400 anos (1566) antes, Amato Lusitano relata pela primeira vez, em França, o caso de um ser humano parasitado com um verme que muito provavelmente seria *D. repens* (Orihel & Eberhard, 1998; Tarello, 2011).

Nos seres humanos as duas espécie mais comumente encontradas (*D. immitis* e *D. repens*) não conseguem na maioria das vezes atingir a maturidade sexual, e a presença dos vermes pré-adultos é responsável por patologia essencialmente pulmonar no caso de *D. immitis* e subcutânea e ocular no caso de *D. repens* (Simón *et al.*, 2005, 2009).

Maioritariamente, os casos de infecção humana com *D. immitis* são assintomáticos (Knauer, 1995; Lee *et al.*, 2010; Đorđević *et al.*, 2010). No entanto em alguns casos existe patologia associada à infecção sendo esta essencialmente pulmonar, este facto deve-se à migração feita pelo parasita dos tecidos subcutâneos, para a corrente sanguínea e daí até as artérias pulmonares. Nesse local e por acção da resposta inflamatória desencadeada pelo hospedeiro o parasita morre e, em consequência, existe a formação de granulomas que podem ser observados radiologicamente (Knauer, 1995; Muro *et al.*, 1999, Theis, 2005). Outros sintomas menos específicos podem estar associados à dirofilariose pulmonar quando esta se encontra presente como tosse, dores torácicas, febre, hemoptise e efusão pleural (Knauer, 1995; Lee *et al.*, 2010). Localizações mais raras como olhos, cérebro e testículos também já foram relatadas para este parasita (Theis *et al.*, 2001; Theis, 2005; Otranto & Eberhard, 2011).

Tal como as infecções por *D. immitis* a maioria das infecções humanas por *D. repens* são assintomáticas (Đorđević *et al.*, 2010; Joseph *et al.*, 2011). As infecções humanas, podem por vezes resultar na formação de nódulos subcutâneos em grande parte devido ao aprisionamento dos vermes, pelo sistema imunitário do hospedeiro. Em casos raros, a migração dos vermes pode ocorrer, sendo possível encontrar parasitas nos pulmões, testículos, seios e olhos (Poppert *et al.*, 2009).

Do ponto de vista epidemiológico a situação actual da dirofilariose está a mudar drasticamente. Apesar dos esforços que têm vindo a ser realizado de modo a reduzir esta parasitose em cães, o facto é que esta está a aumentar nas zonas endémicas e a disseminar-se para zonas onde previamente não havia registos. Uma consequência directa deste facto é o crescente aumento dos relatos de infecções felinas e humanas (Simón *et al.*, 2009; Genchi *et al.*, 2009).

Nos casos humanos relatados parece existir uma forte ligação a áreas com prevalência de dirofilariose canina, presença de vectores competentes e comportamentos humanos que permitem a exposição a esses mesmos vectores (Đorđević *et al.*, 2010).

Publicações retrospectivas que abordam os casos clínicos documentados, indicam a existência de cerca de 300 casos de dirofilariose pulmonar humana e cerca de 800 casos de dirofilariose subcutânea ou ocular (Simón *et al.*, 2009; Đorđević *et al.*, 2010). A maioria dos casos relatados de dirofilariose pulmonar humana foi detectada nos Estados Unidos da América e Japão, por sua vez na Europa a patologia mais descrita é subcutânea ou ocular. As diferenças existentes ao nível do número e origem geográfica dos casos relatados de patologia pulmonar e cutânea, pode ser consequência da maior facilidade em reconhecer a infecção cutânea, por parte dos pacientes e dos médicos. Uma maior consciência médica nos EUA e Japão para a patologia pulmonar, ou ainda pelo facto de na Europa os reservatórios serem espécies domésticas enquanto nos EUA serem maioritariamente animais silváticos (Simón *et al.*, 2009).

Casos humanos de infecção por *Dirofilaria* spp. já foram relatados em países da Europa, Ásia, África, Austrália, América do Norte e América do Sul (Tabela 7) (Rodrigues-Silva *et al.*, 1995; Simón *et al.*, 2005; Dang *et al.*, 2010). Na Europa a maioria casos humanos de dirofilariose relatados ocorreram em países do Mediterrâneo, no entanto tem havido um crescente aumento de relatos em países localizados mais a norte (Muro *et al.*, 1990; Simón *et al.*, 2005; Kartashev *et al.*, 2011). Estudos

retrospectivos de infecções humanas na Europa, documentam a existência de mais de 270 casos, sendo a maioria resultado de infecções por *D. repens*. Dos países da Europa com mais casos relatados destacam-se a Itália (66%), seguindo-se a França (21,7%), a Grécia (8%) e a Espanha (4%) (Muro *et al.*, 1999). Mundialmente a maioria dos casos relatados de dirofilariose humana são causados por *D. repens* (Pampiglione & Rivasi, 2000; Đorđević *et al.*, 2010). Uma revisão que compilou as infecções por *D. repens* relatadas de 1995-2000 mostrou que existiram cerca de 372 casos reportados mundialmente, sendo que a Itália e o Sri Lanka os países que registaram mais casos com 117 e 101 respectivamente. Seguindo-se a Rússia com 63 casos, e ainda com um número significativo de casos registados destacam-se a Ucrânia e a França, ambos com 23 casos (Pampiglione & Rivasi, 2000).

Uma revisão dos 28 casos clínicos, de dirofilariose humana por *D. immitis* no Velho Mundo que estão registados deste 1979 até 2005 permitiu, verificar que muitos deles foram mal diagnosticados, sendo que após a reanálise muitos deles foram diagnosticados pelos autores como infectados por *D. repens*. Com base neste facto os mesmos autores concluem que, não existem provas concretas que permitam afirmar que *D. immitis* desempenhe um papel importante na patologia humana por filárias de origem animal no Velho Mundo (Pampiglione *et al.*, 2009).

No continente asiático casos de infecção já foram relatados na Rússia, Japão, Irão, Índia, Sri Lanka, Malásia, Tailândia, e China (Dang *et al.*, 2010; Kartashev *et al.*, 2011).

Dados de seroprevalência em populações humanas expostas a espécies de *Dirofilaria* demonstram que estas entram frequentemente em contacto com o parasita. Este motivo juntamente com o facto de a maioria das infecções ser assintomática faz com que os casos humanos de dirofilariose sejam habitualmente sub-diagnosticados, uma vez que os casos relatados são apenas uma parte dos casos reais de pessoas infectadas. (Montoya-Alonso *et al.*, 2010; Genchi *et al.*, 2011).

Concluindo, vários autores têm descrito a dirofilariose como uma doença emergente em várias regiões do globo, este facto é apoiado com estudos epidemiológicos recentes que mostram um crescente aumento da prevalência desta doença em muitas dessas áreas (Kramer *et al.*, 2007; Genchi *et al.*, 2011).

Tabela 7 – Alguns países com relatos de casos humanos de dirofilariose

Países	Nº de infecções por <i>D. immitis</i>	Nº de infecções por <i>D. repens</i>	Fonte
Austrália	2 (1971-1999)	<i>N.D</i>	Lee <i>et al.</i> , 2010
Brasil	24 (1982 - 1996)	<i>N.D</i>	Milanez de Campos <i>et al.</i> , 1997
Espanha	<i>N.D</i>	1 (1995-2000)	Pampiglione & Rivasi, 2000
EUA	110 (1941-2001)	<i>N.D</i>	Theis, 2005
França	3	73 (1923-1999)	Raccurt, 2000
Grécia	<i>N.D</i>	35 (1995-2010)	Genchi <i>et al.</i> , 2011
Hungria	<i>N.D</i>	16 (2001-2006)	Szénási <i>et al.</i> , 2008
Índia	21 (2002-2009)	<i>N.D</i>	Joseph <i>et al.</i> , 2011
Irão	3 (<i>N.D</i>)	9 (<i>N.D</i>)	Rokni, 2008
Itália	<i>N.D</i>	321 (1995-2010)	Genchi <i>et al.</i> , 2011
Japão	282 (1964 - 2002)	<i>N.D</i>	Akao, 2011
Rússia	2 (2002-2009)	129 (2002-2009)	Kartashev <i>et al.</i> , 2011
Sri Lanka	<i>N.D</i>	101 (1995-2000)	Pampiglione & Rivasi, 2000
Vietname	<i>N.D</i>	1(2010)	Dang <i>et al.</i> , 2010
<i>N.D</i> - Não descrito			

5 - OBJETIVOS

5.1 – Objectivos

Em Portugal, ainda existem algumas lacunas na informação sobre a situação actual da dirofilariose animal e humana. Um passo importante para o preenchimento dessas lacunas, e tendo em mente que esta parasitose é zoonótica, é o conhecimento da situação epidemiológica dos principais reservatórios (canídeos domésticos) e potenciais vectores.

Alguns estudos realizados sobre dirofilariose canina e felina em Portugal, permitem-nos ter uma ideia do panorama epidemiológico geral desta parasitose no nosso país (Pereira da Fonseca *et al.*, 1991; Gomes, 2002; Sousa *et al.*, 2008; Almeida, 2010; Cardoso *et al.*, 2012). A informação sobre os reservatórios e potenciais vectores é essencial para determinar potenciais áreas de risco para dirofilariose humana, permitindo orientar atenções para essas regiões.

A importância desta parasitose não se esgota na sua capacidade zoonótica. Na realidade a sua maior relevância acontece em termos veterinários, onde esta doença pode ser fatal e onde os custos associados ao seu tratamento e profilaxia são elevados.

Quaisquer novos conhecimentos que venham a ser adquiridos ajudarão a consolidar a informação já existente sobre dirofilariose canina, e dar-nos-ão orientações para a procura de possíveis casos humanos. É nessa perspectiva que o projecto “Ecoepidemiologia de *Dirofilaria* spp: caracterização molecular, vectores potenciais e dinâmica de transmissão”, foi elaborado e desenvolvido pelo Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) em parceria com a Faculdade de Medicina Veterinária (FMV/UTL) e financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT).

O presente trabalho faz parte do projecto acima mencionado, e tem como objectivo geral contribuir para o conhecimento da dirofilariose canina em Portugal.

Como objectivos específicos, este estudo pretende.

- a) Determinar a prevalência canina de dirofilariose em três distritos de Portugal Continental (Coimbra, Setúbal e Santarém) através de métodos directos e imunológicos;
- b) Identificar as espécies responsáveis pela dirofilariose canina em Portugal, tendo em conta que os relatos de dirofilariose causado por *Dirofilaria repens* têm aumentado na Europa e, em Portugal, esta espécie nunca foi descrita;

c) Desenvolver um método molecular (PCR), que poderá ser útil não só para futuros estudos epidemiológicos, como também no diagnóstico diferencial de várias espécies de filárias em Portugal, dado que as técnicas actualmente existentes, não possibilitam um fácil diagnóstico diferencial (Knott) ou são de elaboração morosa e dispendiosa, necessitando de material biológico colhido recentemente como é o caso da técnica das Fosfatases Ácidas.

d) Este trabalho tem ainda como objectivo específico detectar em amostras de sangue de cães infectados com *Dirofilaria* spp., e recorrendo a métodos moleculares (PCR), a presença de *Wolbachia pipientis*, bactéria endossimbionte existente em algumas espécies de filárias com um papel importante na patologia das mesmas.

6 - MATERIAL E MÉTODOS

6.1 – População estudada

A amostra analisada no presente trabalho foi recolhida na população alvo, constituída por indivíduos da espécie *Canis lupus familiaris* presentes em canis municipais ou particulares nas três áreas de estudo. A amostragem foi realizada de 11 de Outubro de 2011 a 29 Novembro do mesmo ano.

Tendo em consideração o ciclo de vida do parasita, e em especial o período pré-patente mínimo descrito na literatura, apenas foram incluídos no estudo animais de idade superior a 6 meses de idade.

As amostras foram recolhidas em três distritos de Portugal Continental (Coimbra, Santarém, Setúbal), regiões do país endémicas para dirofilariose, e com condições ecológicas para o desenvolvimento de grande número de mosquitos vectores. Os estudos prévios realizados naquelas zonas datam de alguns anos atrás, existindo a necessidade de atualização da informação existente.

Além da colheita de sangue a todos os animais, foi também realizado um exame de estado geral, e foi avaliada a idade através de um exame de dentição.

6.2 – Breve caracterização da área de estudo

A área do presente estudo epidemiológico engloba três distritos da região centro de Portugal continental, sendo eles Setúbal, Santarém e Coimbra (Figura10).

O distrito de Setúbal estende-se por uma área de 5 064 Km², e encontra-se dividido por 13 concelhos. Este distrito engloba duas grandes áreas que têm como fronteira o Rio Sado. A primeira dessas regiões denominada como Península de Setúbal, é constituída pelos concelhos de Almada, Montijo, Moita, Barreiro, Alcochete, Seixal, Sesimbra, Palmela e Setúbal, e a segunda designada como Litoral Alentejano, é formada pelos concelhos de Alcácer do Sal, Grândola, Sines e Santiago do Cacém. É um distrito de grande actividade agrícola, predominando a produção de cereais, produtos hortofrutícolas, olivais e vinhedos, sendo a pesca igualmente importante neste distrito, com velhas tradições marítimas e piscatórias (Governo Civil do distrito de Setúbal,2012).

Outro dos distritos estudados, Santarém, conta com uma superfície de 6.581,2 Km², distribuída por 21 concelhos. Geograficamente, este distrito encontra-se localizado na região fértil do Vale do Tejo. Esta região é, caracterizada por fracos declives, modelados pela presença do rio Tejo. Nas margens predomina a Lezíria, com solos de excelente fertilidade, onde se desenvolvem culturas hortofrutícolas, assim como riquíssimos prados naturais que proporcionam a criação de gado (Governo Civil do distrito de Santarém,2012).

Dos distritos estudados, o de Coimbra é o que se encontra geograficamente mais a norte, contando com uma área total de 3.974 Km², distribuída por 17 concelhos. É um distrito de contrastes onde a proximidade do mar e a existência de zonas montanhosas cria grandes diferenças de climática, existindo zonas de clima mais temperado, e zonas mais frias, no interior. Embora seja um distrito com fortes tradições agrícolas, especialmente na produção vinícola, em Coimbra a indústria tem um grande peso socioeconómico. De realçar também o facto, deste distrito ser atravessado pelo maior rio com nascente em Portugal, o rio Mondego (Governo Civil do distrito de Coimbra,2012).



Figura 10 – Mapa de Portugal onde se assinalados os distritos estudados

6.3 – Técnicas de Diagnóstico

Colheita de Material Biológico

De referir que todo o procedimento a seguir descrito foi realizado com a ajuda e colaboração de Médicos Veterinários (MV), da Faculdade de Medicina Veterinária/Universidade Técnica de Lisboa.

Antes da colheita do material biológico, foi realizado um exame clínico geral a todos os cães, e todas as alterações clínicas que pudessem ser relevantes foram devidamente anotadas para posterior análise.

Após o exame, foi retirado a cada indivíduo 3-5ml de sangue da veia cefálica (Figura 11) e armazenado em tubos com EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético). As amostras de sangue foram colocadas em geleiras refrigeradas, de modo a garantir a preservação das amostras até ao regresso ao laboratório,

No laboratório as amostras foram armazenadas em frigoríficos à temperatura de 4°C, até à realização dos testes *WITNESS® Dirofilaria*, Knott modificado e das Fosfatases Ácidas. Posteriormente foram armazenadas a -20°C, até ser realizada a extração do ADN para subsequente análise molecular.

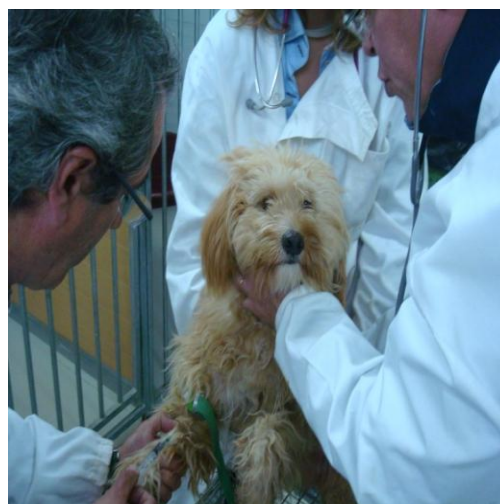


Figura 11 – Recolha de sangue da veia cefálica em alguns dos animais analisados (Fotografias Originais do Autor)

Teste serológico comercial (*WITNESS*[®] *Dirofilaria*)

É um tipo de teste baseado na imunomigração rápida, que utiliza anticorpos contra epitopos de um antígeno solúvel de fêmeas de *Dirofilaria immitis*.

Para a realização do teste uma gota da amostra a testar é colocada na janela circular (Figura 12- 1), juntamente com três gotas de solução tampão. O complexo aqui formado migra sobre a membrana até ser capturado na região reactiva (Figura 12-2/3), nessa zona é possível observar a formação de bandas de cor rosa clara. A interpretação dos resultados é simples e rápida (10 minutos). Amostras positivas apresentam duas bandas cor-de-rosa (Figura 12-A), uma correspondente à faixa controlo e outra à de teste. A presença de uma banda apenas no controlo permite-nos concluir que a amostra é negativa (Figura 12- B). A validade dos testes só é considerada nos casos referidos anteriormente, quaisquer outras combinações de bandas ou mesmo a sua ausência implicam a inviabilidade do teste (Figuras 12- C e D).

A vantagem da utilização deste tipo de teste é o facto de permitir detectar infecções ocultas.

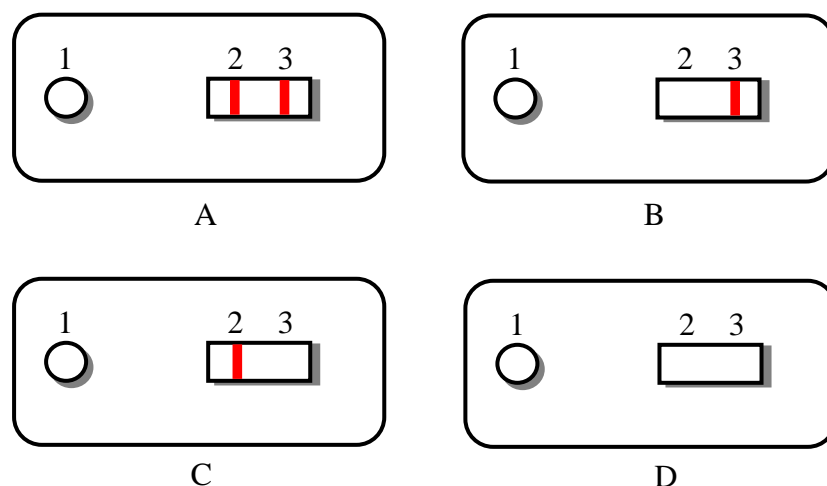


Figura 12 - Esquema ilustrativo da análise e resultados do teste rápido (*WITNESS*[®] *Dirofilaria*)

A - Teste válido e positivo; B- Teste válido e negativo; C e D- Testes inválidos

Detecção de microfilárias (Técnica de Knott modificada)

Esta técnica permite a detecção de microfilárias em canídeos domésticos, ou seja com microfilariemia, e a distinção das espécies de microfilárias recorrendo às suas características morfológicas.

A sua realização inicia-se com a colocação de 1ml de sangue a testar num tubo *falcon* graduado. Em seguida adiciona-se 9 ml de solução de lise, neste caso formol a 2%. A utilização desta solução permite a hemólise de algumas células sanguíneas (eritrócitos) facilitando a observação das microfilárias (Figura 13). A amostra é homogeneizada no vortex e seguidamente centrifugada a 1500 rpm durante 5-8 minutos. Elimina-se o sobrenadante e adiciona-se ao sedimento resultante 1-3 gotas de corante azul de metileno, homogeneizando-se em seguida a solução.

Para observação das microfilárias, uma a duas gotas do sedimento corado e homogeneizado é colocado numa lâmina e coberto com uma lamela (22x40mm) (Figura14). A sua observação e identificação é efectuada ao microscópio com ampliações entre 100 e 1000X.

O diagnóstico diferencial pode ser efectuado recorrendo a algumas características morfológicas das várias espécies de filárias, o que nem sempre é fácil. No caso do presente trabalho esta técnica apenas foi utilizada para identificar os animais microfilaremióticos, devido às referidas dificuldades.

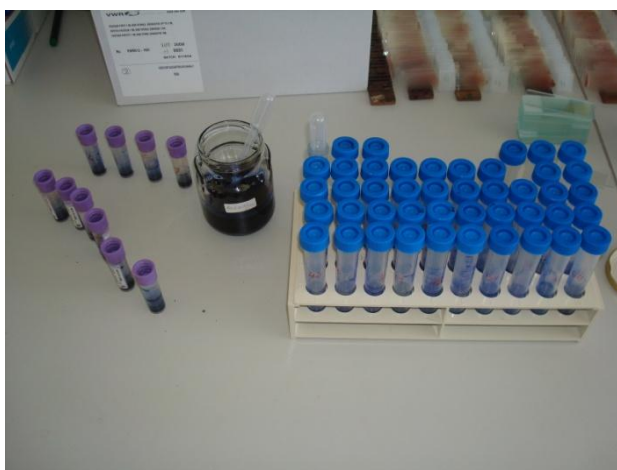


Figura 13 – Amostras processada pela técnica de Knott modificada e prontas a ser colocadas na lâmina para posterior observação ao microscópio óptico (Fotografia Originais do Autor)

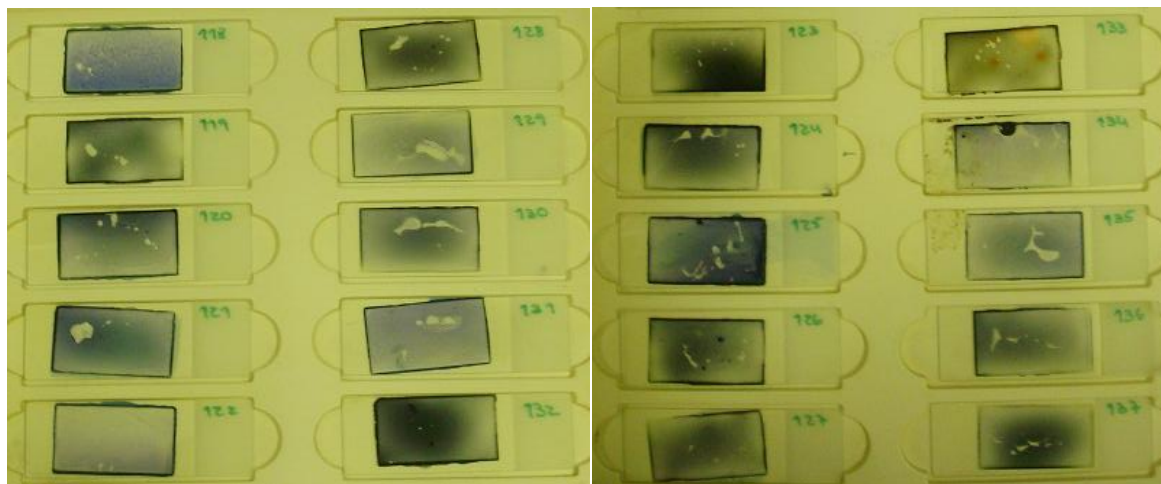


Figura 14 – Amostras em lâmina e lamela da técnica de Knott prontas para a observação ao microscópio óptico (Fotografias Originais do Autor)

Diagnóstico diferencial (Técnica das Fosfatases Ácidas)

Actualmente, uma das técnicas mais exactas para a determinação específica das espécies de filárias que podem ser encontradas nos canídeos domésticos, baseia-se na distribuição somática das fosfatases ácidas nas microfilárias.

O método a seguir referido baseia-se, na técnica descrita por Chalifoux & Hunt em 1971.

A primeira fase desta técnica implicou a realização de dois esfregaços sanguíneos, os quais foram realizados em lâminas de vidro comum para microscopia. O primeiro foi realizado, colocando-se uma gota de sangue numa das extremidades da lâmina (Figura 15- A), em seguida aproximou-se a lamela, com uma inclinação de 45° em relação à gota de sangue e aguardou-se que por capilaridade o sangue se espalhasse (Figura 15- B). Por fim num movimento único e contínuo na direcção oposta, distendeu-se o sangue de modo a formar uma película sanguínea sobre a lâmina (Figura 15- C). O segundo esfregaço foi realizado da mesma forma, excepto o último passo em que foram realizadas duas passagens, de modo a formar uma película sanguínea mais espessa. A fixação dos esfregaços foi realizada numa primeira fase, por dessecação ao ar e, numa segunda fase com acetona absoluta a 4°C durante um minuto.

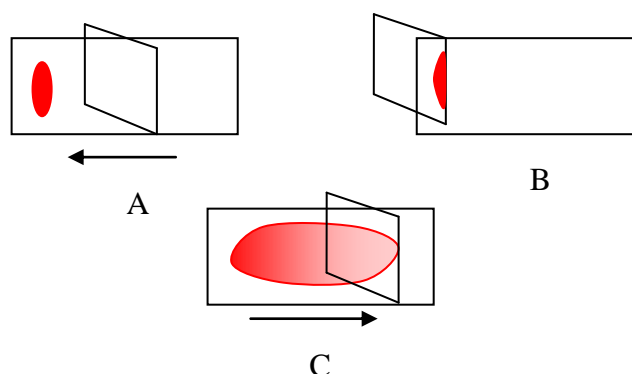


Figura15 - Esquema ilustrativo da realização do esfregaço sanguíneo

A coloração dos esfregaços, para a visualização da actividade das fosfatases ácidas nas microfilárias, é realizada em frascos de Coplin. No entanto antes da coloração propriamente dita é necessário proceder à preparação da solução. Para isso, num balão de Erlenmeyer de 250 ml, junta-se 20 ml de tampão acetato de veronal (Anexo I), com 50 ml de água destilada e 4 ml da solução de Naftol AS-TR fosfato (Anexo I). Separadamente, num gobelé de 10 ml, mistura-se 3,2 ml das soluções de pararosanilina (Anexo I) e nitrado de sódio (Anexo I), para facilitar a homogeneização deve-se realizar o procedimento num agitador magnético.

Posteriormente, a solução de pararosanilina e nitrado de sódio é adicionada ao balão de Erlenmeyer e as soluções são homogeneizadas com o auxílio de um agitador magnético, de modo a formar o substrato usado para corar as filárias. Por fim, deve-se acertar o pH da mistura para 5 com hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1N (Anexo I). A mistura do substrato deve-se realizar-se apenas antes da sua utilização.

A conservação das misturas para posterior utilização é variável, sendo que a solução de Naftol AS-TR fosfato e tampão acetato de veronal pode ser mantida a 4°C por um mês. E a solução de pararosanilina e nitrado de sódio pode ser conservada à mesma temperatura por seis meses.

Para a coloração dos esfregaços foi usado um frasco de Coplin, o substrato foi colocada no frasco até tapar totalmente as lâminas, de seguida procedeu-se à incubação numa estufa por 1 hora a 37°C. Como alternativa pode realizar-se uma incubação mais prolongada, de 2 horas a 25°C. No fim da incubação, retirou-se o substrato e lavou-se abundantemente as lâminas com água destilada. Depois da lavagem, os esfregaços

estão prontos a ser examinados ao microscópio, nesta fase é possível distinguir as espécies de microfilárias de acordo com o padrão de actividade das fosfatases ácidas que apresentam (Tabela 8 e Figura 16). Para aumentar o contraste da coloração, pode ser realizada uma coloração com verde de metilo a 1 % (Anexo I). Neste caso os esfregaços após a lavagem com água destilada, são submersos durante 3 minutos na solução de verde de metilo. Após esse período são retirados e lavados novamente em água destilada. Posteriormente podem ser observados ao microscópio. No presente trabalho, não foi realizada a coloração de contraste anteriormente descrita, uma vez que foram comparados alguns esfregaços com e sem coloração de contraste e não foi observado nenhum ganho na qualidade na visualização.

Tabela 8 – Diferenças observadas em algumas microfilárias coradas pelo método histoquímico das fosfatases ácidas (Adaptado de: Genchi *et al.*, 2007; Serrano *et al.*, 2010).

Espécie	Características
<i>Dirofilaria immitis</i>	Dois locais de actividade das fosfatases ácidas: uma no poro anal outra no poro excretor
<i>Dirofilaria repens</i>	Um local de actividade das fosfatases ácidas: poro anal
<i>Acanthocheilonema reconditum</i>	Apresenta actividade das fosfatases ácidas pela totalidade do corpo
<i>Acanthocheilonema dracunculoides</i>	Apresenta actividade intensa das fosfatases ácidas no poro anal e corpo central, e fraca na região cefálica

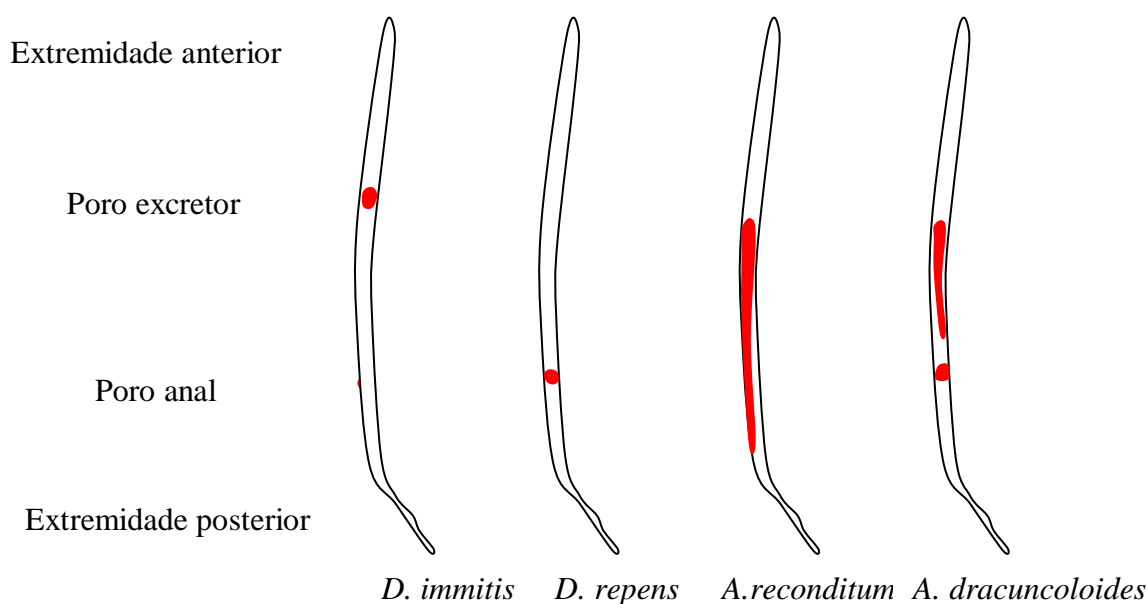


Figura 16 – Esquema da actividade das fosfatases ácidas em diferentes espécies de microfírias (Baseado Schrey & Trautvetter, 1998)

Diagnóstico molecular (*Polymerase chain reaction*)

A utilização de técnicas moleculares permite presentemente e através da detecção do ADN do parasita, uma rápida e correcta determinação da espécie ou espécies de parasitas que podem estar presentes num determinado hospedeiro.

No caso particular da dirofilariose tem existido nos últimos anos algum investimento na optimização de métodos moleculares, que permitam uma fácil detecção das espécies de *Dirofilaria* e outras filárias que afectam os canídeos domésticos (Watts *et al.*, 1999; Mar *et al.*, 2002; Casiraghi *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Gioia *et al.*, 2010; Latrofa *et al.*, 2012).

Como um dos objectivos específicos do presente trabalho se prende com a utilização de um método molecular que possa ser útil para a identificação de espécies de filárias, que possam estar em circulação no nosso país, recorrendo à bibliografia existente sobre o tema, optámos por utilizar a técnica descrita recentemente por Latrofa e colaboradores (2012).

Resumidamente, numa primeira fase foi realizada a extracção de ADN (descrita em pormenor de seguida) das amostras de sangue que se revelaram positivas para qualquer das técnicas acima descritas (*WITNESS*[®] *Dirofilaria*; Técnica de Knott modificada; Técnica das Fosfatases Ácidas), sendo de seguida, realizado um PCR-*Multiplex* para todas as amostras.

Extracção de ADN

O método de extracção de ADN genómico utilizado neste trabalho é, usado com regularidade no Grupo de Helminologia e Malacologia Médica para extracção de ADN de moluscos hospedeiros intermediários helmintoses, nomeadamente *Schistosoma mansoni*. O intuito na utilização deste método de extracção de ADN em vermes adultos de *D. immitis* e em sangue de cães microfilarémicos e não microfilarémicos, foi a sua comprovada eficácia, a relativa facilidade com que é efetuado e, baixo custo quando comparado com *kits* comerciais de extracção de ADN.

O método a seguir descrito é adaptado do protocolo de Stothard e colaboradores (1996).

Previamente o tampão CTAB (100 mM Tris-HCL – “Amresco[®]”, pH 8.0, 1.4M NaCl – “Panreac”, 20 mM EDTA – “Amresco[®]”, 2% *Cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) – “Amresco[®]”) é aquecido na estufa a 56°C, durante 10 minutos. Em tubos *epENDORF* de 1,5ml, são colocados 600µl do tampão. Seguidamente, adiciona-se 10µl de Proteinase K (20mg/ml – “Bioline”), e 50µl de sangue previamente homogeneizado, ou no caso do nemátode adulto, uma secção de cerca de 3cm. As soluções devem ser bem homogeneizadas, e seguidamente devem ser colocadas na estufa a 56°C, durante 2 horas. Neste período as amostras devem ser agitadas de 15 em 15 minutos.

Após a incubação, adicionam-se 600µl de Clorofórmio: Álcool Isoamil (24:1) e agita-se por inversão durante 2 minutos. Realiza-se uma centrifugação rápida, durante 15 segundos a 6000xg.

Em novos *epENDORFs* de 1,5ml, colocam-se 800µl de etanol gelado e de seguida transfere-se o sobrenadante formado da centrifugação anterior para os novos tubos. Procede-se a uma centrifugação de 20 minutos a 10000xg. Posteriormente descarta-se o

sobrenadante, e realiza-se uma lavagem do *pellet* formado, com 500µl de etanol 70%. Efectua-se uma nova centrifugação de 15 minutos a 10000xg. Finalizada a centrifugação retira-se o sobrenadante e procede-se a uma breve incubação (56°C no máximo 10 minutos) de modo a secar o *pellet*.

Na última etapa, procede-se à reidratação do *pellet* adicionando 50 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 –“AppliChem”) ou água destilada. Após este processo, as amostras podem ser mantidas a -20°C até realização do PCR.

PCR- *Multiplex*

Como já referido anteriormente, a técnica molecular usada neste trabalho foi descrita por Latrofa e colaboradores (2012).

O PCR-*Multiplex* foi realizado usando *primers* específicos, de cada espécie, para uma região do gene citocromo c oxidase 1 (*cox1*). Os *primers forward* usados para a detecção das filárias foram: Arcox1F (5'-ATC TTT GTT TAT GGT GTA TC-3'-“StabVida”) para *Acanthocheilonema reconditum*; Drcox1F (5'-GTA TAA TTT TGG GTT TAC ATA CTG TA-3''-“StabVida”) para *Dirofilaria repens* e Dicox1F (5'-ACC GGT GTT TGG GAT TGT TA-3''-“StabVida”) para *Dirofilaria immitis*. Os *primers forward* foram usados juntamente com o primer *reverse* NTR (5'-ATA AGT ACG AGT ATC AAT ATC-3''-“StabVida”). Em caso de uma correcta amplificação, os produtos de amplificação esperados para cada espécie são de diferentes dimensões nomeadamente, 589 pares de bases (pb), 479 pb, 169 pb, respectivamente para *A. reconditum*, *D. repens* e *D. immitis*.

As reacções de PCR foram realizadas num volume final de 25µl. Foram usadas as seguintes concentrações de reagentes: 1x *Green GoTaq® Flexi Buffer* (5x –“Promega”); 2mM MgCl₂ (25mM – “Promega”), 200µM de cada desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTP's); *GoTaq®* 1,25U (5U/µl – “Promega”); 15µM dos *primers* Arcox1F, Drcox1F, Dicox1F e NTR e foram usados 2µl de ADN, excepto no controlo negativo onde foi usado água. Como controlo positivo para *D. immitis* foi usado o ADN resultante da extracção do nemátode adulto, não foi utilizado qualquer controlo positivo de *D. repens* e *A. reconditum*. O protocolo de amplificação foi realizado no termociclador “*Primus 96 advanced gradient*” e as condições usadas foram, um passo inicial de activação da

Taq polimerase a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1 minuto, hibridação a 56°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto. Houve ainda um passo final de extensão a 72°C durante 10 minutos.

Para a confirmação da amplificação dos fragmentos de ADN pretendidos, procedeu-se à separação e visualização em gel de agarose (“*SeaKem® LE Agarose*”) dos produtos obtidos. A separação electroforética foi efectuada a 120V, em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (10mg/ml – “*Bio-Rad*”). Para a preparação do gel foi usado tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA – “*AppliChem*”), usado também como tampão de electroforese. Foram colocados em cada poço 15µl, de cada produto de PCR, excepto no primeiro poço em que foi colocado um marcador de pesos moleculares (*HyperLadder IV* – “*Bioline*”). O resultado final foi visualizado no transiluminador *AlphaImager HP System*.

Gene16S

Os *primers* usados, para a amplificação de parte do gene ribossomal 16S foram descritos por Watts e colaboradores (1999). Os *primers* usados foram *forward* 5'-GCA TCT TAG AAC TTG GTC CAT CC -3' e *reverse* 5'- CAA AGG CGT ATT TAC CGC CAC -3', e o produto de amplificação, esperado tem 440pb.

As reacções de PCR foram realizadas num volume final de 25µl. Foram usadas as seguintes concentrações de reagentes: 1x *Green GoTaq® Flexi Buffer* (5x); 2mM MgCl₂ (25mM), 200µM de cada desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTP's); *GoTaq®* 1,25U (5U/µl); 10µM de cada *primer forward* e *reverse* (“*StabVida*”) e foram usados 2µl de ADN, excepto no controlo negativo onde foi usado água. Como controlo positivo foi usado o ADN resultante da extracção do helminte adulto. O protocolo de amplificação foi realizado no termociclador “*Primus 96 advanced gradient*” e as condições usadas foram, um passo inicial de activação da Taq polimerase a 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, hibridação a 50°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto. Existiu ainda uma extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Para a confirmação da amplificação foi utilizado o procedimento descrito anteriormente no PCR-*Multiplex*.

A utilização de outros *primers*, para a identificação molecular da espécie de filária presente no sangue de alguns cães microfilarémicos prendeu-se com o facto de em algumas amostras analisadas com o PCR-*Multiplex* não ter existido qualquer tipo de amplificação.

Detecção de *Wolbachia*

A detecção desta bactéria gram-negativa, endosimbionte de algumas filárias da família Onchocercidae, entre as quais *Dirofilaria immitis* e *D. repens*, foi realizada no presente trabalho recorrendo a um método descrito por Rossi e colaboradores (2010).

A detecção de ADN de *Wolbachia* nas amostras de sangue recolhidos, foi efectuada recorrendo a PCR.

O PCR foi realizado usando *primers* específicos, de *Wolbachia*, para uma região do gene *Filamenting temperature-sensitive mutant Z* (ftsZ). Os *primers* usados foram *forward* 5'-ATA ACA GCA GGA ATG GGT GGT-3' e *reverse* 5'-TCA CGC ACT CTA TTT GCT GCA-3', e o produto de amplificação esperado tem 550 pb. As reacções de PCR foram realizadas num volume final de 25µl. Foram usadas as seguintes concentrações de reagentes: 1x *Green GoTaq® Flexi Buffer* (5x); 2mM MgCl₂ (25mM), 200µM de cada desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTP's); *GoTaq®* 1,25U (5U/µl); 5µM de cada primer *forward* e *reverse* ("StabVida") e foram usados 2µl de ADN, excepto no controlo negativo onde foi usado água. Como controlo positivo foi usado o ADN resultante da extracção de *Drosophila melanogaster* infectadas com *Wolbachia* (gentilmente cedidas pelo Doutor Luis Teixeira - Instituto Gulbenkian Ciência). O protocolo de amplificação foi realizado no mesmo termociclador descrito para as amplificações anteriores e as condições usadas foram, um passo inicial de activação da Taq polimerase a 94°C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, hibridação a 58°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 30 segundos. Houve ainda um passo final de extensão a 72°C durante 10 minutos.

Para a confirmação da amplificação dos fragmentos de ADN pretendidos, foi novamente usado o procedimento descrito no PCR-*Multiplex*.

6.4 – Análise Estatística

A estimação das prevalências de dirofilariose nos diferentes distritos estudados foi um dos objectivos principais do presente trabalho. Os dados foram informatizados e tratados através do *Microsoft Office Excel 2007* e *IBM SPSS*. Para a estimação das prevalências através de intervalos de confiança a 95% pelo método de Wilson, foi usado o programa EPITools (Sergeant, 2009).

O programa de análise estatística *SPSS*, também foi com o intuito de determinar possíveis factores de risco para o desenvolvimento de dirofilariose e ainda possíveis associações entre achados clínicos e a doença. Foram então, analisadas eventuais associações estatísticas entre a dirofilariose e algumas variáveis qualitativas como é o caso do sexo, tipo de pelagem, grupo etário, distrito de origem, existência de lesões cutâneas, tamanho dos linfonodos e alterações cardíacas encontradas. Para tal utilizou-se o Teste de Qui-quadrado de Pearson (χ^2), e sempre que os pressupostos necessários para a sua utilização não foram verificados optou-se pelo teste Teste Exacto de Fisher. Em ambos os casos foi usado como valor significativo, $P\text{-value} \leq 0,05$.

A nível estatístico foi ainda usada a medida de concordância Kappa para avaliar o grau de concordância entre os diferentes testes de diagnósticos utilizados.

6.5 – Considerações Éticas e Legais

O projecto “Ecoepidemiologia de *Dirofilaria* spp: caracterização molecular, vectores potenciais e dinâmica de transmissão”, teve em consideração todas as questões éticas e legais necessárias.

As entidades municipais e privadas das regiões alvo do estudo emitiram parecer positivo para a realização e elaboração de todas as fases do referido projecto, o qual foi previamente submetido à Comissão de Ética da FMV.

Todas as pessoas e instituições envolvidas na realização deste projecto, foram previamente esclarecidas sobre o propósito e finalidade do mesmo.

Os dados recolhidos durante a realização do projecto acima mencionado, estão sujeitos a sigilo e confidencialidade. Toda a informação revelada durante ou após o

término do projecto terá sempre em consideração este facto. Nenhum local, pessoa ou instituição onde os trabalhos foram realizados, será explicitamente identificado de modo a garantir o seu anonimato e privacidade. Após a devida análise da informação obtida, esta será facultada aos respectivos responsáveis das instituições envolvidas.

7 - RESULTADOS

7.1 – Características gerais da população estudada

Nos três distritos, examinaram-se 309 cães. Devido aos critérios de inclusão no estudo, das 309 colheitas efectuadas, uma amostra foi excluída dado o animal à qual pertencia apresentava uma idade inferior a 6 meses, considerada limite devido ao período pré-patente de *D. immitis*. Sendo assim, na totalidade foram analisadas pelas técnicas anteriormente descritas 308 amostras sanguíneas. A nível distrital a amostragem encontra-se distribuída da seguinte maneira: 170 amostras provenientes de quatro canis municipais no distrito de Santarém; 40 amostras provenientes de apenas um canil municipal no distrito de Setúbal e 99 amostras originárias de dois canis (um municipal e um particular) no distrito de Coimbra.

A amostra da população canina estudada apresentava uma média de idades estimada em 4,9 anos com um desvio- padrão de 3,3 anos, sendo que os indivíduos mais novos apresentavam 6 meses de idade (0,5 anos) e o mais velho 16 anos (Figura 17).

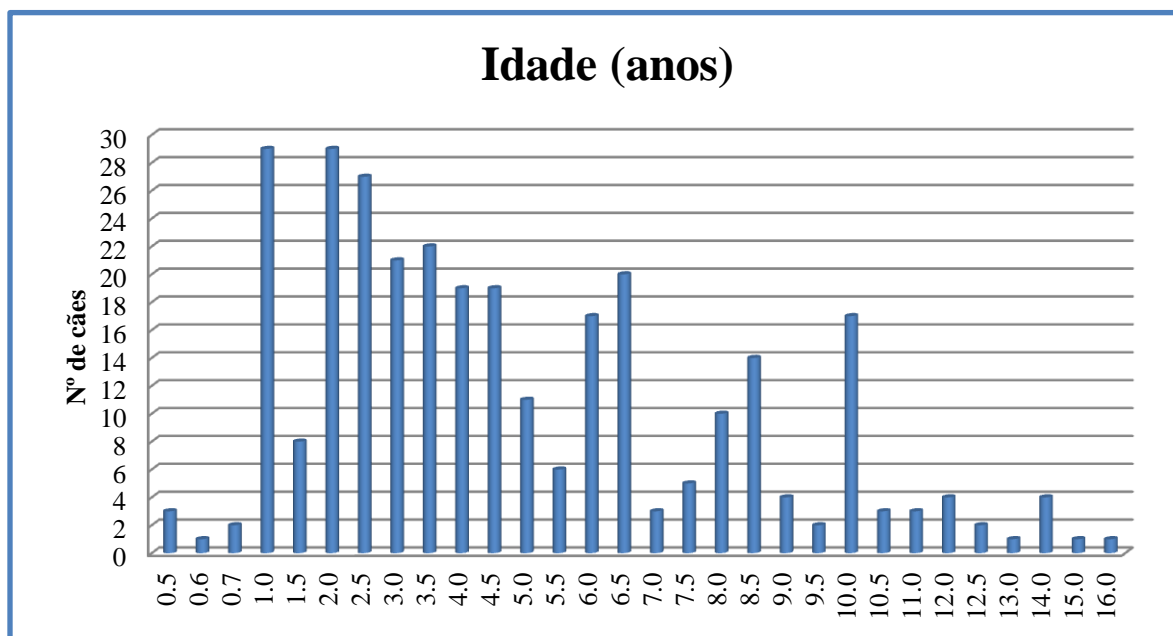


Figura 17 – Gráfico representativo das idades dos animais analisados

Dos indivíduos incluídos no estudo, o grupo etário com maior representatividade (58,1%), inclui os indivíduos com idade superior a um ano até aos seis anos (Figura 18).

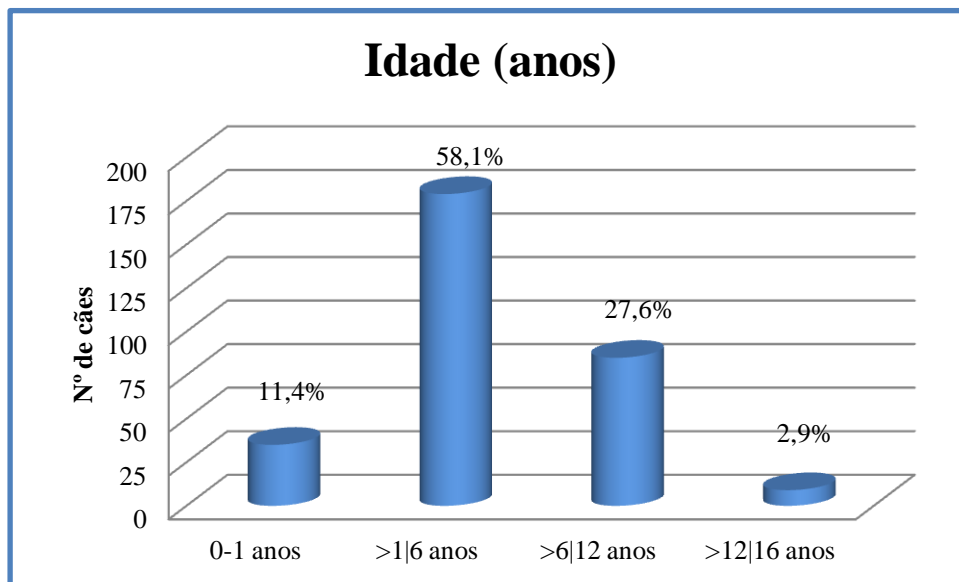


Figura 18 – Gráfico representativo dos grupos etários dos animais incluídos no estudo

Neste estudo as amostras foram recolhidas maioritariamente de animais do sexo feminino (59,4% - 183/308), e com pelagem curta (64,6% - 199/308) (Figuras 19 e 20).

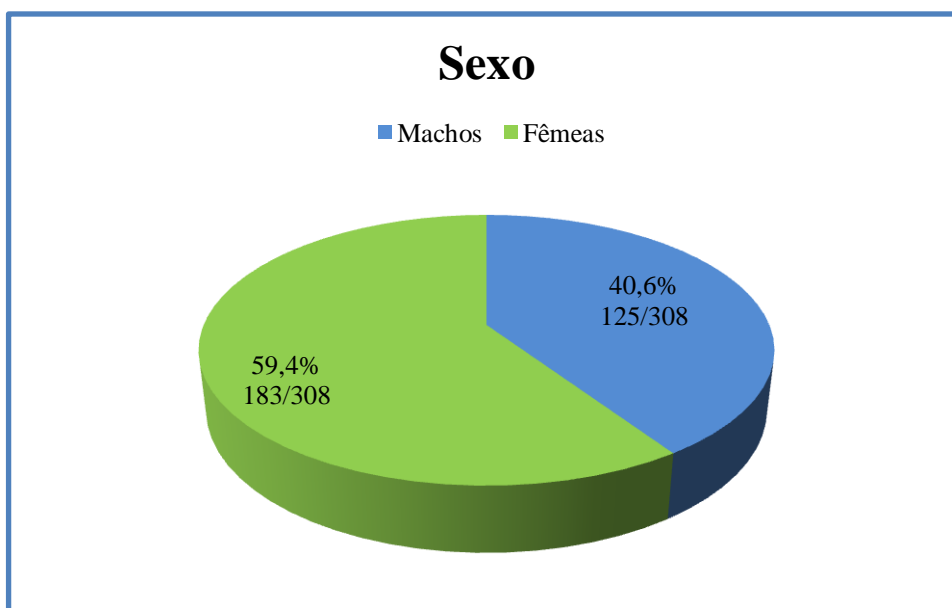


Figura 19 – Distribuição da amostra analisada por sexo

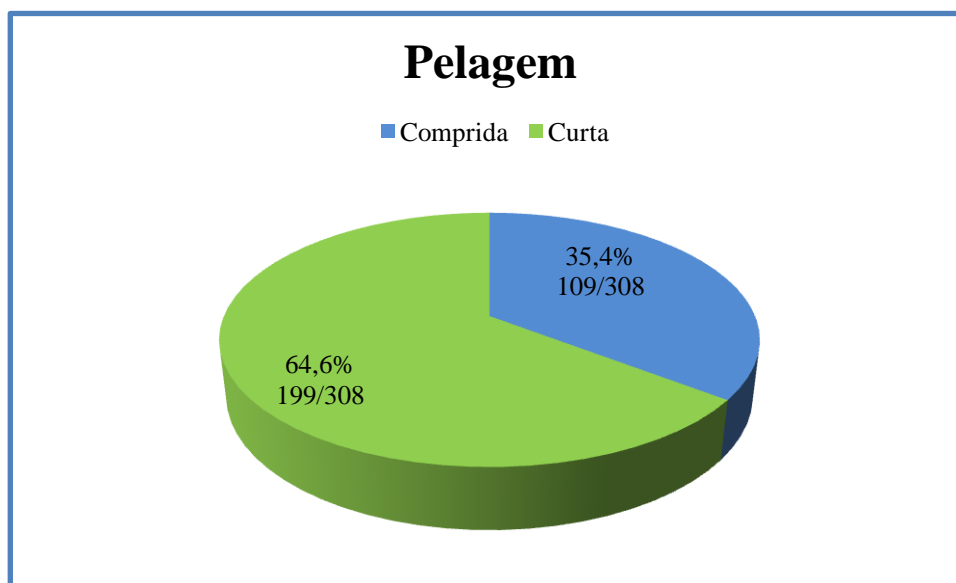


Figura 20 – Gráfico representativo do tipo de pelagem encontrada nos animais incluídos no estudo

7.2 – Manifestações clínicas observadas

Do exame de estado geral realizado a todos os animais, podemos destacar três parâmetros que foram os mais frequentes: a existência de lesões cutâneas, o estado dos linfonodos e as alterações cardíacas.

Dos animais analisados, a generalidade (80,5% - 248/308) não apresentava qualquer indício de lesão cutânea e os 60 indivíduos (19,5%) com lesões, foram incluídos em dois grupos distintos: grupo de animais com feridas, que inclui indivíduos com lesões extensas e bem visíveis. Os animais com pequenas escoriações foram incluídos no grupo das feridas ligeiras (Figuras 21 e 22).



Figura 21 – Exemplo de feridas encontradas nos animais examinados

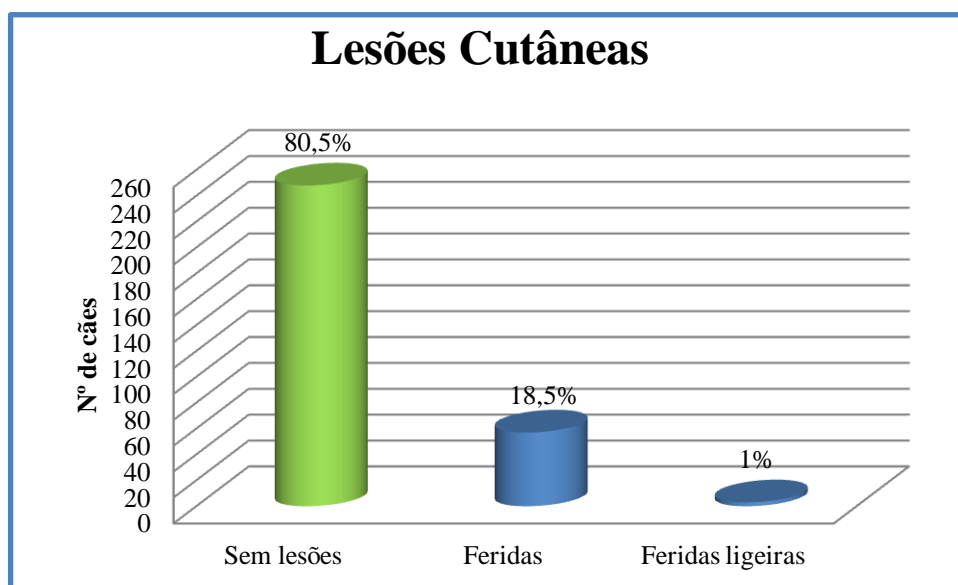


Figura 22 – Caracterização do tipo de lesões cutâneas encontradas nos animais incluídos no estudo

Ao nível dos linfonodos, 61 (19,8%) dos canídeos domésticos examinados evidenciavam um aumento dos mesmos (Figura 23).

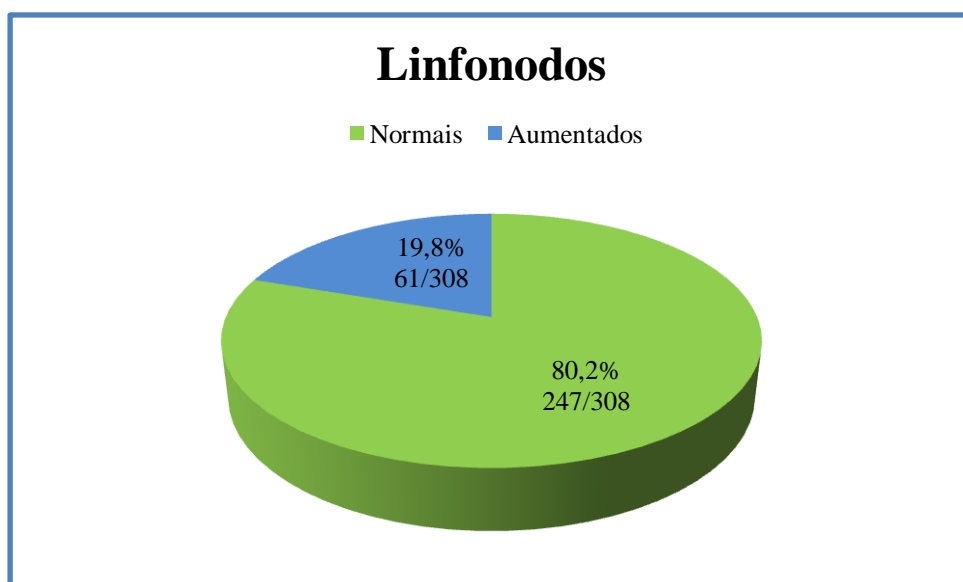


Figura 23 – Caracterização da condição dos linfonodos dos animais incluídos no estudo

Dos três parâmetros referidos anteriormente, as alterações cardíacas foram talvez o parâmetro que podia ser mais facilmente associado à dirofilariose por *D. immitis*. Dos animais examinados e auscultados pelos MV, quase 10% apresentavam algum tipo de alteração cardíaca. Sendo o sopro médio (6,2% - 19/308) a alteração cardíaca mais verificada, seguida do sopro ligeiro (2,6% - 8/308) e do sopro grave e arritmias, apenas, encontradas em 3 cães (0,9%) (Figura 24).

Outros parâmetros mais gerais e que podem também ser associados à fase crónica de dirofilariose, como de outras patologias, são a perda de peso e tosse, estes sinais foram verificados em 5 (1,6%) animais, sendo que 4 indivíduos (1,3%) apresentavam sinais de perda de peso e 1 (0,3%) tosse.

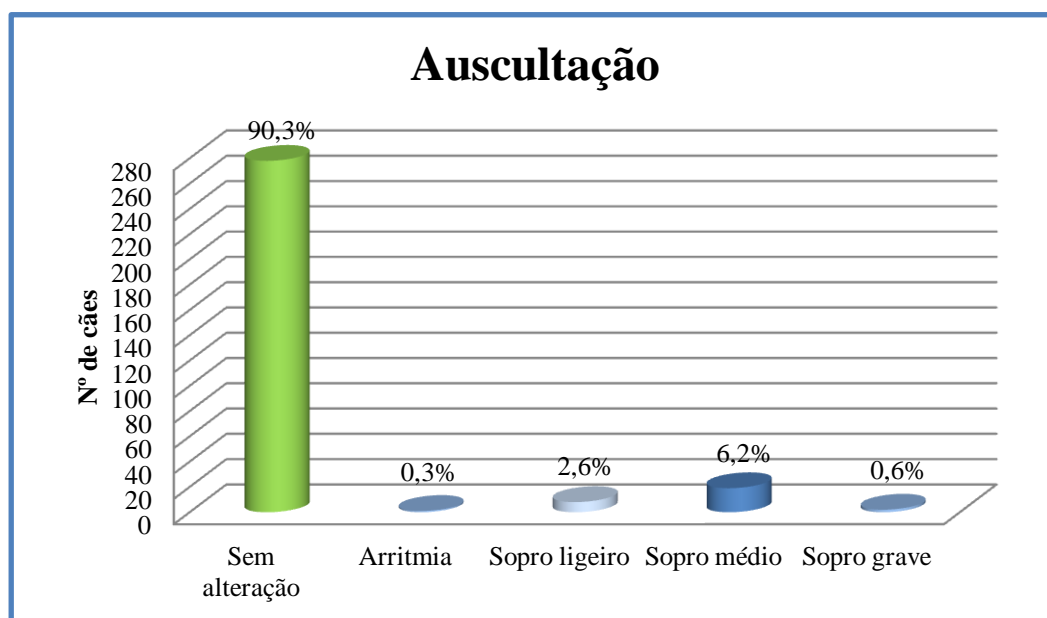


Figura 24 – Caracterização das alterações cardíacas encontradas

7.3 – Resultados parasitológicos

Métodos de WITNESS® *Dirofilaria*, Técnica de Knott modificada e Técnica das Fosfatases Ácidas

Dos 308 testes rápidos WITNESS® *Dirofilaria* realizados (Figura 25), 33 animais apresentavam antígenos de *Dirofilaria immitis* em circulação, representando assim de acordo com esta técnica uma prevalência global de dirofilariose de 10,7%; IC95% 7,7-14,7% (Figura 26).

A nível de cada distrito, observou-se uma prevalência que variou entre 10,1%, no distrito de Santarém (17/169), IC95% 6,4-15,5%, e no distrito de Coimbra (10/99), IC95% 5,6-17,6%, e 15% no distrito de Setúbal (6/40), IC95% 7,1- 29,1%.



Figura 25 – Exemplos de alguns testes *WITNESS*® *Dirofilaria* realizados

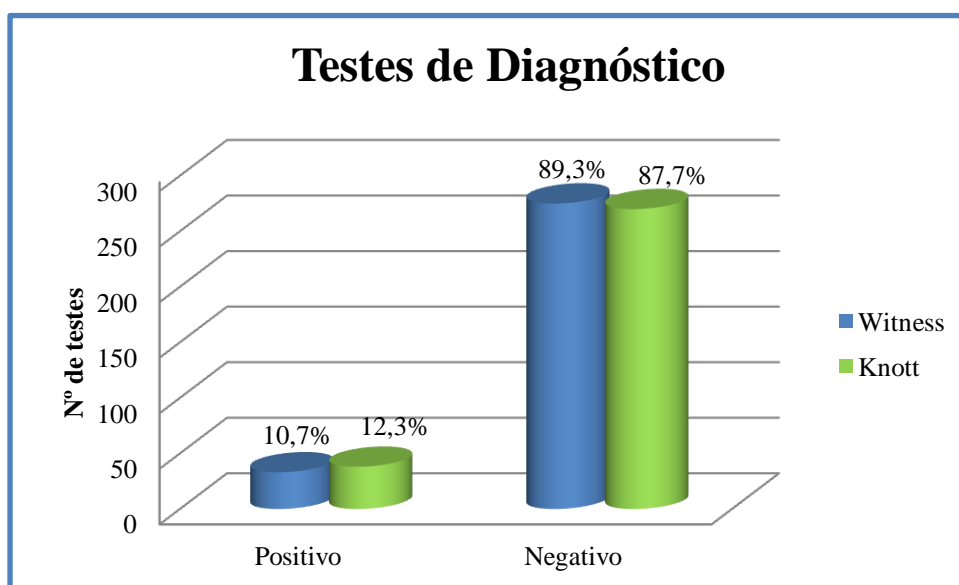


Figura 26 – Resultados dos testes de *Witness*® *Dirofilaria* e Knott, no cômputo geral dos três distritos analisados

A técnica de Knott modificada (Figura 27), como já foi referido anteriormente no presente trabalho apenas foi usada como forma de identificar o número de cães que

apresentavam microfilárias em circulação, independentemente da sua espécie. Os resultados indicam, uma prevalência global de cães microfilarémicos de 12,3%, IC95% 9,1- 16,5% (38/308), e prevalências distritais de 8,1%, IC95% 4,2- 15,1% (8/99) em Coimbra, 13%, IC95% 8,8- 18,9% (22/169) em Santarém e de 20%, IC95% 10,5- 34,8% (8/40) no distrito de Setúbal.

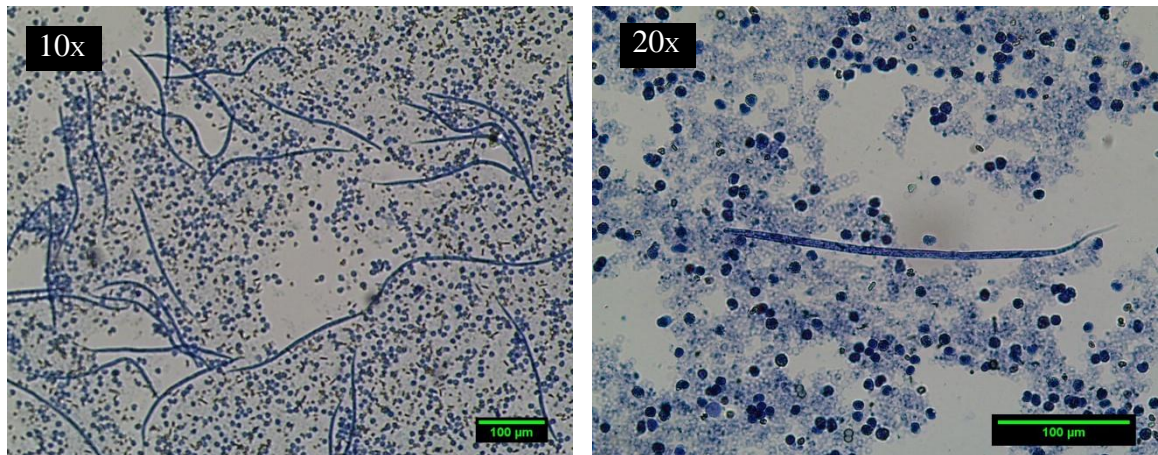


Figura 27 – Microfilárias presentes em alguns dos sangues analisados pela técnica de Knott modificada (Fotografias Originais do Autor)

Para a identificação das espécies de microfilárias em circulação nos três distritos, foi realizada a técnica das fosfatases ácidas. Na quase totalidade das amostras que apresentaram microfilárias (37/38 – 97,4%) foi possível identificar a espécie de microfilária presente. A totalidade (100%) das microfilárias foi identificada como *Dirofilaria immitis*, uma vez que apresentavam uma coloração típica desta espécie, ou seja, apresentavam actividade das fosfatases ácidas no poro anal e poro excretor (Figura 28). Numa das amostras pertencente a um cão microfilarémico (técnica de Knott), não foi possível através desta técnica identificar a espécie de microfilária, uma vez que nos esfregaços realizados não se encontrava presente nenhuma microfilária. Com estes resultados observamos que na nossa amostra não existem casos de co-infecção e, aparentemente, as prevalências apresentadas de *D. immitis* obtidas pela técnica de Knott modificada poderão reflectir as prevalências globais e de cada distrito.

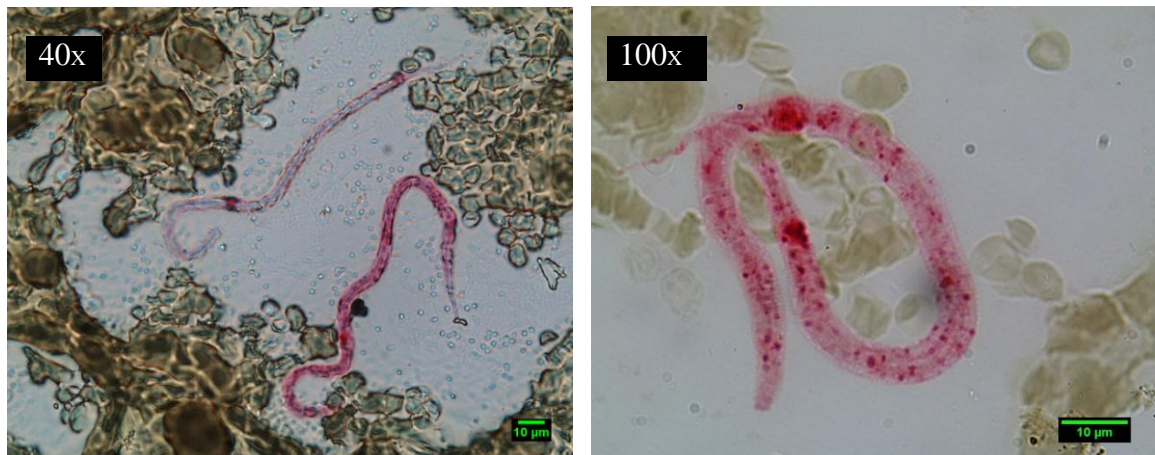


Figura 28 – Microfilárias coradas com a técnica das fosfatases ácidas (Fotografias Originais do Autor)

De salientar que a discrepância de prevalências existente, entre as técnicas utilizadas, se deve ao facto de nem todas as amostras que foram positivas no teste rápido, terem sido positivas na técnica de Knott modificada e, consequentemente na técnica de fosfatase ácidas. Globalmente nos três distritos, 14 das amostras que foram positivas para a presença de microfilárias, revelaram-se negativas quando analisadas com o teste comercial de detecção de antígenos. Por outro lado 9 dos canídeos analisados apresentavam sinais de infecção oculta, ou seja, não revelaram a presença de microfilárias (técnica de Knott), apesar de o teste comercial indicar a presença de infecção.

Para que não exista uma subestimação das prevalências, inerente às limitações dos testes de diagnóstico utilizados, as prevalências a seguir apresentadas têm em linha de conta os casos de infecções ocultas e as amostras apenas positivas pela técnica de Knott. Analisando os resultados e considerando que um animal se encontra infectado quando apresenta pelo menos um dos dois testes positivos, observamos uma prevalência global de *D. immitis* de 15,3%, IC95% 11,7- 19,7% (47/308), e prevalências distritais de, 12,1%, IC95% 7,1- 20% (12/99) em Coimbra, 14,8%, IC95% 10,2- 20,9% (25/169) em Santarém e 25%, IC95% 14,2- 40,2% (10/40) em Setúbal (Figura 29).

Estatisticamente não foi encontrada qualquer diferença significativa entre as prevalências encontradas e os três distritos analisados ($\chi^2 = 3,717$; $P = 0,156$)

A análise estatística da concordância existente entre os testes utilizados (índice Kappa), demonstra uma forte concordância (0,985) entre os testes de detecção (Knott) e a diferenciação de microfilárias (fosfatase ácida), e valores mais modestos quando comparamos o teste rápido de detecção de antígenos circulantes (*Witness*), com o Knott (0,634) e com o teste das fosfatases ácidas (0,646).

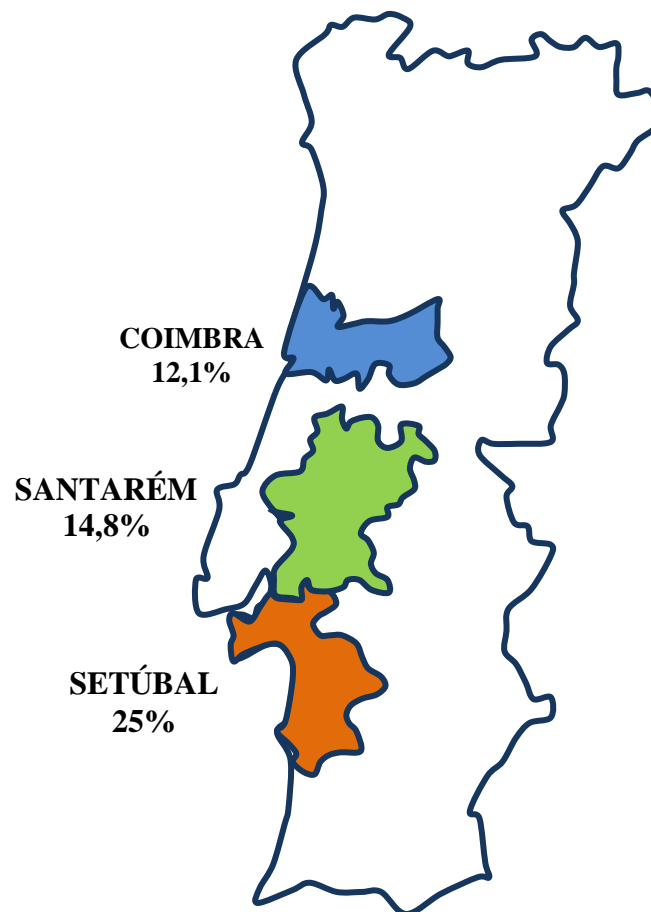


Figura 29 – Prevalências de *D. immitis* nos distritos estudados, conjugando as técnicas de Knott e *Witness*

Em relação ao parasitismo por *D. immitis*, a análise dos diferentes parâmetros amostrais analisados, como a idade, sexo e pelagem, constatou-se, que o grupo etário mais afectado foi o dos animais mais jovens (> 1-6 anos). Com efeito, dos 179 animais analisados, 20,1% (36/179), estavam infectados (Tabela 9). Globalmente, este facto representa 11,7% (36/308) dos animais infectados, verificando-se diferenças significativas entre os grupos etários ($\chi^2 = 8.977$; $P = 0,030$).

Tabela 9 – Prevalência de cães infectados nos três distritos estudados, de acordo com o grupo etário

Idade (anos)	Nº de cães examinados	Nº de cães infectados (%)*
[0-1]	35	1 (2,9%)
]1-6]	179	36 (20,1%)
]6-12]	85	9 (10,6%)
]12-16]	9	1 (11,1%)
Total	308	47 (15,3%)

*Inclui os cães detectados infectados pelo teste WITNESS® *Dirofilaria* + teste Knott modificado

Se analisarmos apenas os animais infectados (n=47), constatamos que 76,5% dos animais infectados tinha entre 1 e 6 anos de idade

A maioria dos animais analisados, como já referido anteriormente, eram do sexo feminino (183) e desses 12,6% (23/183) revelaram estar infectados com *D. immitis*. Por sua vez, dos machos analisados, 19,2% (24/125), estavam infectados (Tabela 10). No presente estudo não foi verificada qualquer diferença significativa na prevalência de infecção entre machos e fêmeas ($\chi^2 = 2,526$; $P = 0,1120$).

Tabela 10 – Prevalência de cães infectados nos três distritos estudados, de acordo com sexo

Sexo	Nº de cães examinados	Nº de cães infectados (%)*
Machos	125	24 (19,2%)
Fêmeas	183	23 (12,6%)
Total	308	47 (15,3%)

*Inclui os cães detectados infectados pelo teste WITNESS® *Dirofilaria* + teste Knott modificado

Uma das características que pode também ter alguma importância nos casos de dirofilariose é a pelagem do animal, porque pode influenciar a capacidade dos vectores

efectuarem a refeição sanguínea e a conseqüentemente, a infecção dos cães. A nossa amostragem demonstra que 15,6% (31/199) dos animais com pelagem curta estavam infectados, praticamente a mesma proporção de animais com pelagem comprida, 14,7% (16/109) (Tabela 11). Também neste caso não foi verificada qualquer diferença estatisticamente significativa entre a pelagem dos animais e a prevalência de infecção encontrada ($\chi^2 = 0,044$; $P = 0,8339$).

Tabela 11 – Prevalência de cães infectados nos três distritos estudados, de acordo com a pelagem

Pelagem	Nº de cães examinados	Nº de cães infectados (%)*
Curta	199	31 (15,6%)
Comprida	109	16 (14,7%)
Total	308	47 (15,3%)

*Inclui os cães detectados infectados pelo teste *WITNESS*[®] *Dirofilaria* + teste Knott modificado

Dos parâmetros observados no exame de estado geral, destacamos as alterações cardíacas observadas por ser o sinal clínico mais frequentemente associado à dirofilariose. Neste caso observamos que apenas um cão em que ambos os testes foram positivos (*WITNESS* e Knott), apresentava sinais de sopro médio. Os restantes canídeos domésticos parasitados não apresentavam qualquer alteração cardíaca (Tabela 12). Neste caso as prevalências encontradas não apresentam qualquer diferença estatisticamente significativa entre animais com e sem alterações cardíacas (Teste Exacto de Fisher $P = 0,0614$).

Tabela 12 – Prevalência de alterações cardíacas nos cães infectados nos três distritos estudados

Auscultação	Nº de cães examinados	Nº de cães infectados (%)*
Sem alteração	278	46 (16,5%)
Com alterações	30	1 (3,3%)
Total	308	47 (15,3%)

*Inclui os cães detectados infectados pelo teste *WITNESS*[®] *Dirofilaria* + teste Knott modificado

Ao nível dos outros dois parâmetros do exame de estado geral (Tabela 13), a análise estatística também não revela qualquer relação estatisticamente significativa entre as prevalências encontradas e a existência de lesões cutâneas ($\chi^2 = 0,114$; $P = 0,7356$) e a dimensão dos linfonodos ($\chi^2 = 0,076$; $P = 0,7833$).

Tabela 13 – Prevalência de lesões cutâneas e dimensões dos linfonodos nos cães infectados, nos três distritos estudados

Lesões Cutâneas	Nº de cães examinados	Nº de cães infectados (%)*
Com Lesões	60	10 (16,7%)
Sem Lesões	248	37 (14,9%)
Total	308	47 (15,3%)

Linfonodos	Nº de cães examinados	Nº de cães infectados (%)*
Aumentados	61	10 (16,4%)
Normais	247	37 (15%)
Total	308	47 (15,3%)

*Inclui os cães detectados infectados pelo teste *WITNESS*[®] *Dirofilaria* + teste Knott modificado

Outros sinais clínicos foram menos detectados nos cães infectados como, a perda de peso, apenas observada em dois canídeos, e a tosse que não se observou em nenhum dos cães parasitados.

7.4 – Resultados da análise molecular

Foram realizadas no total 47 extrações de ADN, correspondendo às amostras para as quais obtivemos resultados positivos na técnica de Knott modificada e no teste rápido *WITNESS*[®] *Dirofilaria*. Todas as amostras foram subsequentemente analisadas por PCR-*multiplex*. Das 47 amostras analisadas pelo PCR-*multiplex*, em 29 houve a amplificação de uma banda de 169 pares de bases, expectável no caso de as amostras apresentarem ADN de *Dirofilaria immitis* (Figura 30). Todas as amostras que se revelaram positivas no PCR-*multiplex* apresentavam também microfilárias. Nove amostras pertencentes a cães microfilarémicos não apresentaram qualquer produto de PCR, quando foi realizada a visualização do gel de agarose.

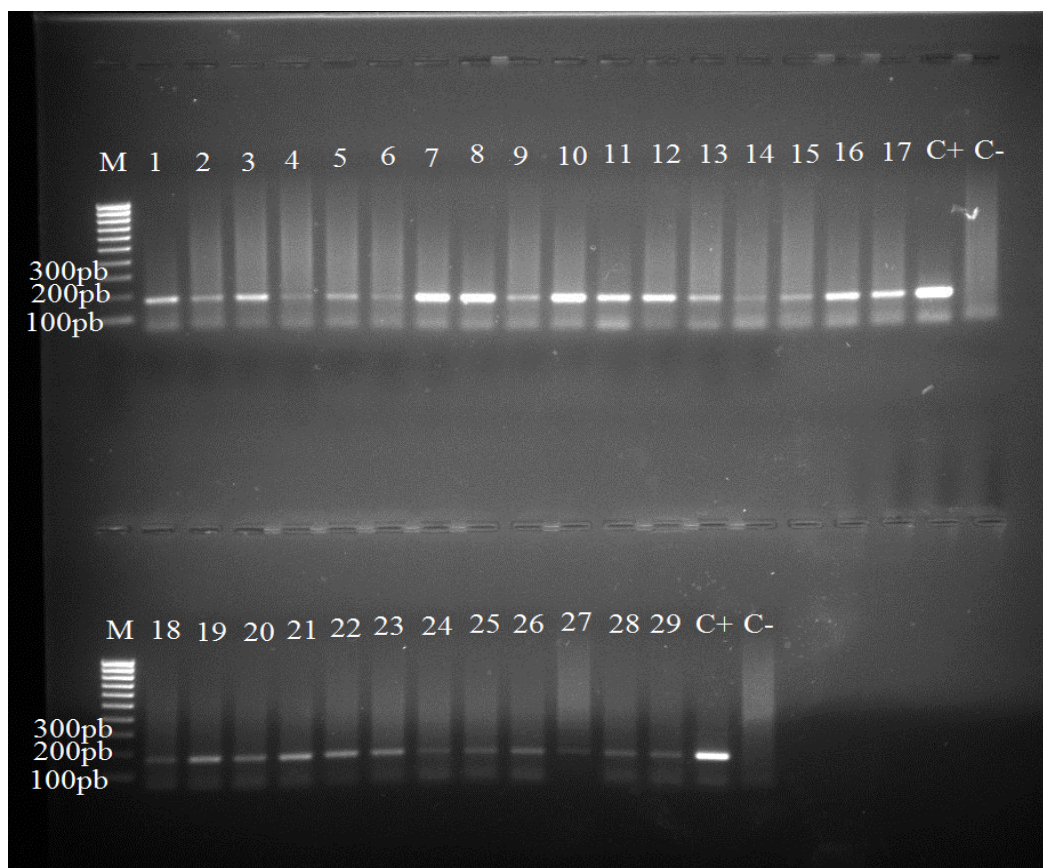


Figura 30 – Gel de agarose com amostras positivas para *Dirofilaria immitis*, em cães microfilarémicos. M- Marcador peso molecular; C+ Controlo positivo; C- Controlo negativo

Em nenhuma das 9 amostras onde apenas foram detectados antígenos circulantes de *D. immitis*, existiu amplificação de qualquer produto de PCR facto que já era expectável (Figura 31).

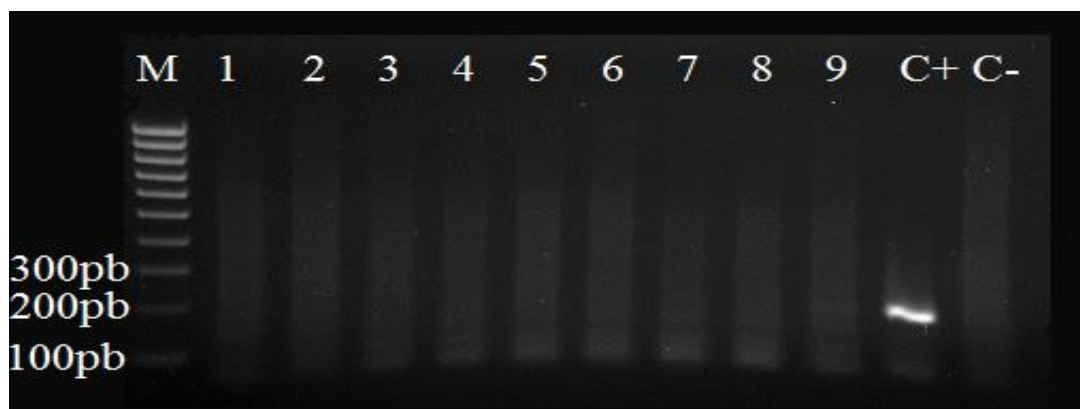


Figura 31 – Gel de agarose com amostras negativas para *Dirofilaria immitis*, em cães não microfilarémicos. **M**- Marcador de peso molecular; **C+** Controlo positivo; **C-** Controlo negativo

É importante referir que as 9 amostras de cães microfilarémicos, que não apresentaram qualquer produto de amplificação com os *primers* do PCR-*multiplex*, foram testadas posteriormente com *primers* para outro gene mitocondrial (16S) e neste caso houve amplificação confirmando a nível molecular a presença de *D.immitis* nessas amostras.

A detecção do endossimbionte, *Wolbachia pipientis*, com os *primers* escolhidos apenas foi possível efectuar em 14 amostras, todas elas pertencentes a cães microfilarémicos (Figura 32).

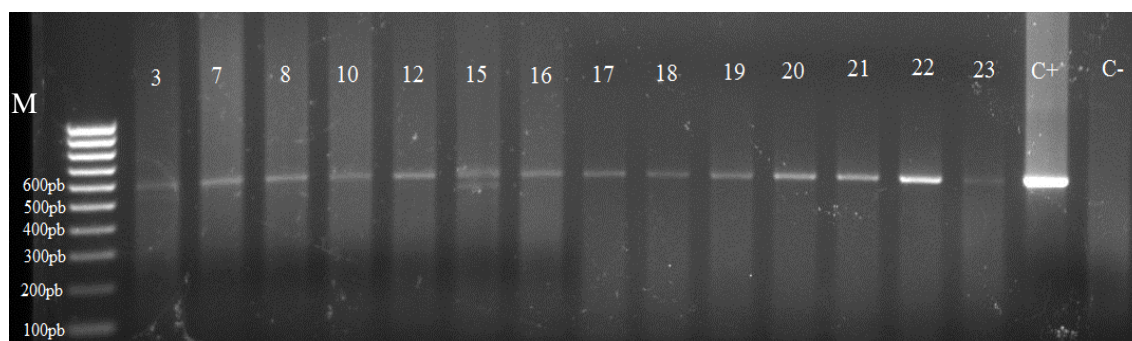


Figura 32 – Gel de agarose com amostras positivas para *Wolbachia pipientis*. **M**- Marcador de peso molecular; **C+** Controlo positivo; **C-** Controlo negativo

8 - DISCUSSÃO/CONCLUSÃO

No nosso país, embora os estudos de dirofilariose canina esporádicos e pontuais têm dado alguma aproximação ao panorama geral da doença. Apesar disso, informação recente e actualizada é necessária e importante, uma vez que nos últimos anos a nível europeu tem havido um crescente aumento dos casos relatados de infecção em humanos e em reservatórios animais. Este aumento acontece não só em países já com uma história de endemicidade, mas mais relevante que isso ocorre agora em países onde antes a transmissão autóctone desta zoonose estava ausente ou pelo menos era desconhecida pela comunidade científica.

A presença de dirofilariose canina nas zonas analisadas no presente trabalho não era novidade quando se iniciaram os trabalhos, no entanto, o presente trabalho veio reforçar essa concepção e permite ter uma percepção da situação epidemiológica actual dos distritos analisados e da região centro do nosso país.

Uma das primeiras observações que se podem retirar do presente trabalho diz respeito às técnicas de diagnóstico e aos resultados deles obtidos. No trabalho todos os cães encontrados parasitados, apenas o estavam por *Dirofilaria immitis* (Figura 28; página 77), não tendo sido encontrados casos de co-infecção com *Acanthocheilonema reconditum*, ou até mesmo com *D. repens*. O crescente aumento de casos relatados de dirofilariose na vizinha Espanha e em outras partes da Europa, em especial os causados por *D. repens* faziam antever a possibilidade de este agente já se encontrar em Portugal. No entanto, tal como em todos os trabalhos anteriormente realizados essa evidência ainda não foi possível confirmar.

Os estudos realizados anteriormente, apesar de importantes e úteis para o conhecimento da parasitose já tinham sido realizados há bastante tempo e alguns deles foram feitos efectuados recorrendo apenas a uma técnica de diagnóstico parasitológico. O facto de se recorrer apenas a um método de diagnóstico, seja ela detecção de microfilárias (Knott) ou a detecção de antigénios (testes comerciais), devido à natureza e à dinâmica da infecção pode levar a uma subestimação dos casos de infecção. Quando falamos de estudos epidemiológicos temos de ter presente que são analisadas muitas amostras e numa parasitose com uma grande dinâmica como é o caso da dirofilariose, as limitações inerentes aos testes de diagnóstico disponíveis devem ser tidas em conta. Nestes casos, idealmente deve ser usado uma combinação de testes, de modo a evitar que algum caso de infecção não seja diagnosticado.

Dos testes disponíveis para a detecção de casos de dirofilariose podemos destacar dois dos mais comumente utilizados, o primeiro é usado para a detecção de microfilárias em circulação (Knott). A sua utilização nem sempre acontece, uma vez que não é imediato, é moroso e não permite a identificação dos casos de infecções ocultas, isto é, casos de animais infectados mas sem microfilárias em circulação. O outro método de diagnóstico, mais utilizado actualmente, diz respeito à detecção de antígenos de nemátodes fêmeas adultos, os testes disponíveis para esse efeito são comerciais, e têm a vantagem de serem fáceis de utilizar e de de leitura imediata. No entanto, também apresentam limitações, nomeadamente, a sensibilidade variável e influenciável pelo número de fêmeas presentes e o facto de apenas detectarem casos em que existam fêmeas a parasitar. Estes motivos fazem com que a utilização de apenas um deles seja muitas vezes insuficiente para um correcto diagnóstico e justificam os casos relatados neste trabalho em que alguns animais só apresentaram um dos testes positivos.

Tendo estas restrições em mente, optou-se neste trabalho por utilizar ambas as técnicas, juntamente com a técnica das fosfatases ácidas que permite um diagnóstico diferencial mais preciso, de modo a minimizar ao máximo as limitações de ambos os testes, permitindo ter uma noção mais correcta das prevalências da doença.

Em estudos anteriores, as prevalências encontradas nos três distritos agora analisados foram tal como agora diferentes. No distrito de Coimbra, num estudo realizado em 2007 os autores, que recorreram tal como no nosso caso à detecção de microfilárias e de antígenos em circulação obtiveram uma prevalência de 13% (Sousa *et al*, 2008), uma prevalência muito semelhante à encontrada no nosso caso (12,1% - Figura 29; página 78), indiciando que a situação epidemiológica neste distrito não sofreu grande alteração nos últimos anos.

No distrito mais central dos três agora estudados, Santarém, obtivemos uma prevalência global (Knott + *Witness*) de 14,8% (Figura 29; página 78), que comparativamente com o estudo realizado anteriormente onde apenas foi utilizada a técnica de Knott modificada a diferença já é considerável (16,7%) (Pereira da Fonseca *et al.*, 1991). No entanto, ao compararmos os resultados obtidos apenas pela técnica de Knott em ambos os trabalhos as diferenças acentuam-se mais, com a prevalência actual a cifrar-se nos 13%. O motivo para a prevalência mais elevada no trabalho realizado em 1991, pode dever-se ao facto de naquela altura nenhum dos métodos de diagnóstico

diferencial ter sido realizado, o que não permite assegurar que todos os cães encontrados parasitados estivessem realmente parasitados apenas e só por *D. immitis*, podendo alguns casos corresponder a infecções por *A. reconditum*.

O distrito de Setúbal foi sem dúvida o distrito onde as diferenças entre as prevalências de estudos passados e a do presente trabalho foram mais acentuadas, sendo que no estudo realizado há uma década atrás verificou-se uma prevalência de 37,5% (Gomes, 2002) e a encontrada presentemente cifra-se nos 25% (Figura 29; página 78). Neste caso, a explicação para a variação existente não pode ter a ver com as técnicas usadas porque em ambos os casos foram usadas técnicas semelhantes. O decréscimo verificado na última década neste distrito pode ser uma consequência da interacção de factores como: o próprio local onde os canis estavam localizados, uma vez que o estudo anterior focou-se em canis não só da zona urbana como da zona mais periférica e ribeirinha e, no nosso caso apenas foi considerado um canil que se localizava numa zona urbanizada; a diminuição/alteração da população vectora na área; a própria dinâmica da parasitose ao longo do tempo; ou ainda de uma maior sensibilização das populações para esta problemática e uma maior utilização de medicamentos profiláticos. Todos estes aspectos são importantes, o que faz com que mais estudos nesta área e em outras sejam importantes. Ainda assim, não podemos deixar de considerar que o facto de um quarto da população canina estar infectada constitui um risco substancial em termos de saúde animal e pública.

Um dos elementos importantes que podemos observar com os resultados agora obtidos juntamente com o dos outros estudos, prende-se com o facto de o número de casos desta parasitose aumentar claramente de norte para sul (Figura 29; página 78) pelo menos na região centro do país. Também um estudo serológico nacional realizado este ano parece apontar para esse cenário e permite alargá-lo a todo o país (Cardoso *et al.*, 2012). A explicação para este facto, está intimamente ligada à população de vectores, e às variações das condições climáticas e geográficas que permitem o seu estabelecimento e proliferação. Outra circunstância, que não deve ser posta de lado, prende-se com as populações humanas e a sua maior ou menor sensibilização para esta zoonose e para as respectivas medidas profiláticas, que são de extrema importância para o seu controlo.

A análise pormenorizada das características da população canina estudada em relação ao parasitismo por *D. immitis* permite em alguns casos tirar ilacções

semelhantes a outros a outros estudos. Um desses casos é que muitos autores consideram um importante factor de risco em zonas endémicas é a idade (Montoya *et al.*, 1998; Jalali *et al.*, 2010). No nosso trabalho a análise estatística significativa vai ao encontro desses resultados e demonstra que os cães mais velhos, em especial os com idade compreendida entre um e os seis anos, têm uma maior probabilidade de estar infectados (Tabela 9; página 79), podendo esta ocorrência ser justificada pelo maior tempo de exposição aos potenciais vectores infectantes.

Tal como em outros estudos um número maior de machos (19,2% - Tabela 10; página 79) foi encontrado parasitado, porém no nosso trabalho não foi encontrada qualquer associação estatisticamente significativa. As maiores taxas de infecção encontradas em machos e as associações estatísticas encontradas nalguns estudos, são sustentadas por alguns autores pelo facto de os vectores serem atraídos mais pelos machos, ou pelo facto de os machos serem mais frequentemente usados como cães de guarda e de caça, e por isso serem mantidos no exterior das habitações e ao ar livre, estando por isso sujeitos a um maior contacto com potenciais vectores (Montoya *et al.*, 1998; Traversa *et al.*, 2010; Jalali *et al.*, 2010). No nosso trabalho apesar de uma maior percentagem de machos ter sido encontrada infectada, tentar justificar os resultados observados é difícil uma vez que desconhecemos o passado dos animais que se encontravam nos canis, nomeadamente, o tipo de aptidão e o nível de exposição a potenciais vectores.

Uma outra característica que se julgava relevante para a infecção era o tamanho do pêlo do animal. No entanto alguns estudos (Cringoli *et al.*, 2001; Scaramozzino *et al.*, 2005; Jalali *et al.*, 2010), incluindo o nosso, não encontram qualquer associação estatisticamente significativa. Não obstante este trabalho mostra que uma percentagem maior de cães com pelo curto (15,6% - Tabela 11; página 80) foi encontrada infectada.

Os parâmetros clínicos observados em todos os animais, e em especial nos animais infectados, foram todos eles muito gerais e por este motivo não é de estranhar que nenhuma associação estatisticamente significativa tenha sido encontrada. Podendo existir outras causas que expliquem os achados clínicos independentes da dirofilariose. Estes resultados vão ao encontro de outros que revelam que na maioria das infecções por *D. immitis*, os canídeos não apresentam qualquer tipo de sinais clínicos característicos (Bowman & Atkins, 2009; Shearer, 2011). Contudo, estudos anteriores também

demonstraram que uma parte dos animais infectados com *D. immitis*, em especial os que já se encontram numa fase mais avançada da doença pode apresentar sinais como perda de peso, tosse, alterações cardíacas entre outros (Bowman & Atkins, 2009). Alguns destas alterações também foram observados no nosso estudo.

A análise molecular preliminar testada no trabalho foi realizada com o intuito de tentar estabelecer qual seria a melhor opção de metodologia de diagnóstico em termos futuros para o projecto no qual este estudo se insere.

Da análise das técnicas moleculares, apesar de não terem sido analisadas todas as amostras, por restrições de tempo, algumas ilacções úteis para o futuro podem ser tiradas. Em primeiro lugar, e apesar de ser reconhecidamente mais sensível e específico pela comunidade científica comparativamente a outras técnicas de diagnóstico, o PCR no caso da dirofilariose permite apenas identificar cães infectados e respectivos agentes etiológicos no caso de os cães serem microfilarémicos (Figura 30/31; página 82/83), podendo ser usado quando devidamente optimizado, como uma alternativa mais sensível que a técnica das fosfatases ácidas, permitindo um maior rigor e rapidez na determinação do agente etiológico. A impossibilidade de identificar o agente etiológico, no caso das infecções ocultas é justificada pela inexistência de ADN do agente nas amostras testadas, impossibilitando a sua detecção.

Os *primers* de primeira linha escolhidos (PCR-*multiplex*) parecem não ser os mais indicados para a identificação de todas as espécies de filárias que possam estar a infectar os canídeos domésticos portugueses, uma vez que só permitiu identificar parcialmente todos os casos de infecção por *D. immitis*, o único agente etiológico encontrado no presente trabalho. Algumas explicações podem ser consideradas para este facto, mas a mais plausível será provavelmente a diversidade no património genético existente nas filárias presentes no nosso país, impedindo que os *primers* descritos funcionem correctamente em todos os casos. Outras limitações inerentes à própria técnica, como a sua difícil optimização, resultante de uma possível competição entre os *primers*, podem ajudar a justificar os casos de cães microfilarémicos onde não foi possível identificar o agente etiológico. Um outro aspecto importante que não pode ser menosprezado e que contribuiu para a limitação da optimização da técnica (PCR-*multiplex*), foi a impossibilidade de adquirir controlos positivos para as todas as espécies de filárias, nomeadamente *A. reconditum* e *D. repens*, impossibilitando aferir a

correcta funcionalidade de todos os *primers* utilizados. Pelos motivos acima apresentados, e numa tentativa de obter mais alguma informação, optamos por testar as amostras onde não foi possível com o PCR-*multiplex* a identificação da espécie de filária, comprovar molecularmente a presença de ADN de *D. immitis*, utilizando outros *primers* também eles já descritos na literatura. Deste modo foram seleccionados um par de *primers* para uma porção do gene 16S, o que nos permitiu comprovar a presença de ADN de *D. immitis*. Com estes dados corroboramos em parte os resultados obtidos pelos métodos parasitológicos, onde apenas foram identificados casos de dirofilariose por *D. immitis*. Contudo, verificámos que não foi possível otimizar e encontrar um conjunto de *primers* úteis para todas as situações de infecção, sendo necessário continuar a testar.

Ainda a nível molecular, tentou-se identificar a presença do endossimbionte, *Wolbachia*, nos animais parasitados. No nosso caso e ao contrário do descrito na literatura, só foi possível detectar a presença de *Wolbachia* numa parte dos cães microfilarémicos (Figura 32; página 83). A não detecção do ADN desta bactéria endossimbionte, que comprovadamente existe em todas as fases do ciclo de vida de *D. immitis* (Kramer, 2006), não nos leva a concluir a sua ausência, levanta antes a questão da sensibilidade da técnica e até que ponto esta consegue detectar o ADN de *Wolbachia* nos casos onde o número de microfílias é mais reduzido. A utilização de uma técnica mais sensível, como o *real-time* PCR pode ser útil e trazer mais informação sobre esta questão.

Como conclusões finais podemos assinalar o facto de mais uma vez ter sido demonstrado que Portugal é um país endémico de dirofilariose por *D. immitis*, embora ainda nenhum caso de dirofilariose por *D. repens* ter sido detectado nos canídeos. De acordo com os resultados actuais a prevalência global de dirofilariose canina por *D. immitis* na região centro do país situa-se nos 15,3%, um valor considerável tendo em linha de conta as complicações clínicas que os animais infectados podem vir a ter e o seu potencial zoonótico. Estes aspectos levam a que mais estudos na população canina portuguesa sejam necessários de modo a ser reunida mais informação sobre o panorama global desta doença no nosso país. É também importante chamar a atenção sobre esta zoonose fazendo campanhas de sensibilização junto dos donos, canis privados e

municipais, sendo este passo de extrema importância para a diminuição da incidência da dirofilariose canina, no nosso país.

Um aspecto importante desta parasitose é o seu potencial zoonótico, sendo mesmo considerada nalguns países europeus como a Itália, França, Hungria e Rússia uma doença emergente (Genchi *et al.*, 2011). No nosso país, contudo, nenhum estudo na população humana portuguesa foi realizado, ao contrário do que acontece em outros países endémicos da Europa. Isto faz com que apenas considerações, com base noutros estudos realizados, possam ser transpostos para a situação do nosso país. A maioria dos casos de dirofilariose humana detectados na Europa deve-se a *D. repens*, resultado da maior visibilidade dos sinais clínicos, o que facilita o seu diagnóstico e identificação. No entanto, em Portugal, não se encontra relatado nenhum caso recente de dirofilariose humana. Contudo, se observarmos os estudos serológicos realizados em Espanha e em Itália que mostram que 30% de pessoas saudáveis apresentam anticorpos contra *Dirofilaria* (Simón *et al.*, 2005). E considerando os resultados do estudo realizado recentemente, numa população humana, por investigadores espanhóis que mostra uma sero-prevalência de 11% contra antígenos de *D. immitis* (Genchi *et al.*, 2011), levanta-se a questão de qual será a situação do nosso país em relação a esta doença zoonótica que muita gente desconhece.

9 - BIBLIOGRAFIA

- Akao, N. (2011). Human Dirofilariasis in Japan. *Tropical Medicine and Health* , 39(1): 65–71.
- Almeida, C. (2010). *Prevalência de Dirofilariose Felina na Região do Sado*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa. pp. 113.
- American Heartworm Society: Graham, W., Rubin, S., Boeckh, A., Buzhardt, L., Jones, S., Miller, M., Payne, P., Rehm, C., Smith-Blackmore, M., Stannard, R., Nelson, C. T., Atkins, C., Carithers, D., McCall, J. & von Simson, C.(2012a). *Current Feline Guidelines for the Diagnosis, Prevention, and Management of Heartworm (Dirofilaria immitis) Infection in Cats*. [online] Disponível em: <http://heartwormsociety.org/veterinary-resources/Guidelines-Feline-HW-Disease.pdf>. Obtido em 20 de Fevereiro de 2012.
- American Heartworm Society: Graham, W., Rubin, S., Boeckh, A., Buzhardt, L., Jones, S., Miller, M., Payne, P., Rehm, C., Smith-Blackmore, M., Stannard, R., Nelson, C. T., Atkins, C., Carithers, D., McCall, J. & von Simson, C. (2012b). *Current Canine Guidelines for the Diagnosis, Prevention, and Management of Heartworm (Dirofilaria immitis)*. [online] Disponível em: <http://heartwormsociety.org/veterinary-resources/canine-guidelines.html>. Obtido em 20 de Fevereiro de 2012.
- Anderson, R. C. (2000). *Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission*. 2nd Edition. Wallingford, CABI Publishing. pp. 650.
- Anderson, R. C., Chabaud, A. G., & Willmott, S. (2009). *Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates*. Archival Volume. Wallingford, CAB International. pp.463.
- Bandi, C., Trees, A.J. & Brattig, N.W. (2001). *Wolbachia* in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. *Veterinary Parasitology* , 98: 215-238.
- Boss, N. & Shearer, P. (2011). The Basics of Heartworm Disease. *Banfield Journal* , 7(2) 8-14.

- Bowman, D. D. & Atkins, C. E. (2009). Heartworm Biology, Treatment, and Control. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* , 39(6): 1127 - 1158.
- Bowman, D., Little, S., Lorentzen, L., Shields, J., Sullivan, M. & Carlin, E. (2009). Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: results of a national clinic-based serologic survey. *Veterinary Parasitology* , 160(1-2):138-418.
- Bowman, D. D. (2011). Introduction to the Alpha-proteobacteria: *Wolbachia* and *Bartonella*, *Rickettsia*, *Brucella*, *Ehrlichia*, and *Anaplasma*. *Topics in Companion Animal Medicine* , 26(4): 173-177.
- Cancrini, G. & Gabrielli, S. (2007). Chapter 3: Vectors of *Dirofilaria* nematodes: biology, behaviour and host/parasite relationships. In Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G., (Eds.), 2007. *Mappe Parassitologiche: Dirofilaria immitis and D.repens in dog and cat and human infections*. Italy: Rolando Editore. pp. 48 - 58.
- Cardoso, L., Mendão, C. & Madeira de Carvalho, L. (2012). Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. *Parasites & Vectors* , 5:62.
- Casiraghi, M., Bain, O., Guerrero, R., Martin, C., Pocacqua, V., Gardner, S., Franceschi, A. & Bandi, C. (2004). Mapping the presence of *Wolbachia pipientis* on the phylogeny of filarial nematodes: evidence for symbiont loss during evolution. *International Journal for Parasitology* , 34(2):191-203.
- Casiraghi, M., Bazzocchi, C., Mortarino, M., Ottina, E. & Genchi, C. (2006). A simple molecular method for discriminating common filarial nematodes of dogs (*Canis familiaris*). *Veterinary Parasitology* , 141(3-4): 368–372.
- Chalifoux, L. & Hunt, R. D. (1971). Histochemical Differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum*. *Journal of the American Veterinary Medical Association* , 158(5): 601-605.

- Cringoli, G; Rinaldi, L; Veneziano, V and Capelli, G (2001). A prevalence survey and risk analysis of filariasis in dogs from the Mt. Vesuvius area of southern Italy. *Veterinary Parasitology*, 102: 243-252
- da Silva, R. C. & Langoni, H. (2009). Dirofilariose. Zoonose emergente negligenciada. *Ciência Rural* , 39(5): 1614-1623.
- Dang, T., Nguyen, T., Do, T., Uga, S., Morishima, Y., Sugiyama, H. & Yamasaki, H. (2010). A human case of subcutaneous dirofilariasis caused by *Dirofilaria repens* in Vietnam: histologic and molecular confirmation. *Parasitology Research* , 107(4): 1003-1007.
- Dantas-Torres, F. (2008). Canine vector-borne diseases in Brazil. *Parasites & Vectors* , 1:25.
- Đorđević, J., Tasić, S., Miladinović-Tasić, N. & Tasić, A. (2010). Diagnosis and Clinical Importance of Human Dirofilariosis. *Acta Facultatis Medicae Naissensis* , 27(2):81-84.
- Dunn, A. M. (1978). *Veterinary Helminthology*. 2nd Edition London, William Heineman Medical Books Ltd. pp.323.
- European Scientific Counsel Companion Animal Parasites - ESCCAP (2009). *Control of Vector – Borne diseases in Dogs and Cats. ESCCAP Guideline 05 – September 2009*. Worcestershire, United Kingdom: ESCCAP. [online] Disponível em: http://www.esccap.org/index.php/fuseaction/download/lrn_file/esccap-gl5-vbddec09.pdf. Obtido em 16 de Novembro de 2011.
- Ferasin, L. & Knight, D. (2005). Chapter 5: Filarial infections. In Shaw, S. E. & Day, M. J. *Arthropod-borne infectious diseases of the dog and cat*. London: Manson Publishing, pp.51-61.
- Ferri, E., Bain, O., Barbuto, M., Martin, C., Lo, N., Uni, S., Landmann F, Baccei, S.G., Guerrero, R., de Souza Lima, S., Bandi, C., Wanji, S., Diagne, M. & Casiraghi, M. (2011). New Insights into the Evolution of *Wolbachia* Infections in Filarial Nematodes Inferred from a Large Range of Screened Species. *PLoS ONE* , 6(6): e20843..

- Frank, K. & Heald, R. (2010). The emerging role of wolbachia species in heartworm disease. *Compendium Continuing Education for Veterinarians* , 32(4): 1-5.
- Furtado, A. P., Melo, F. T., Giese, E. G. & Santos, J. N. (2010). Morphological Redescription of *Dirofilaria immitis*. *Journal of Parasitology* , 96(3): 499 - 504.
- Genchi, C., Rinaldi, L., Cascone, C., Mortarino, M. & Cringoli, G. (2005). Is heartworm disease really spreading in Europe?. *Veterinary Parasitology* , 133(2-3): 137-148.
- Genchi, C., Venco, L. & Genchi, M. (2007). Chapter 11: Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infections. In Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G., (Eds.), 2007. *Mappe Parassitologiche: Dirofilaria immitis and D.repens in dog and cat and human infections*. Italy: Rolando Editore. pp. 137-144.
- Genchi, C., Rinaldi, R., Mortarino, M., Genchi, M., & Cringoli, G. (2009). Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Veterinary Parasitology* , 163(4): 286-292.
- Genchi, C., Kramer, L. H. & Rivasi, F. (2011). Dirofilarial Infections in Europe. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* , 11(10): 1307-1317.
- Gioia, G., Lecová, L., Genchi, M., Ferri, E., Genchi, C. & Mortarino, M. (2010). Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. *Veterinary Parasitology* , 172:160–163.
- Gomes, J. (2002). *Epidemiological study of canine dirofilariasis in Setubal county. Its relevance as zoonosis*. Tese de Mestrado , Instituto de Higiene e Medicina Tropical - Universidade Nova de Lisboa, pp. 93.
- Gouveia, M. I. (2007). *Susceptibility of mosquito vectors to Dirofilaria immitis on Madeira Island, Portugal*. Tese de Doutoramento. Universidade da Madeira. pp.109.

- Governo Civil do distrito de Coimbra (s.d). Disponível em: <http://www.gov-civil-coimbra.pt/>. Obtido em 12 Abril 2012
- Governo Civil do distrito de Santarém (s.d). Disponível em: <http://www.gcs.pt/>. Obtido em 18 Maio 2012
- Governo Civil do distrito de Setúbal (2008). Disponível em: <http://www.gov-civil-setubal.pt/>. Obtido em 18 Maio 2012
- Grandi, G., Zivicnjak, T. & Beck, R. (2007). Chapter 4: Pathogenesis of *Dirofilaria* spp. infections. In Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G., (Eds.), 2007. *Mappe Parassitologiche: Dirofilaria immitis and D.repens in dog and cat and human infections*. Italy: Rolando Editore. pp. 60-66.
- Grandi, G., Morchon, R., Kramer, L., Kartashev, V. & Simon, F. (2008). *Wolbachia* in *Dirofilaria repens*, an Agent Causing Human Subcutaneous Dirofilariasis. *Journal of Parasitology* , 94(6):1421-1423.
- Hoch, H. & Strickland, K. (2008). Canine and Feline Dirofilariasis: Life Cycle, Pathophysiology, and Diagnosis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 30(3):133 - 141.
- Hou, H., Shen, G., Wu, W., Gong, P., Liu, Q., You, J., Caia, Y., Li, J. & Zhanga, X. (2011). Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in dogs from Dandong, China. *Veterinary Parasitology* , 183(1-2):189-193.
- Hunt, P. (2011). Molecular diagnosis of infections and resistance in veterinary and human parasites. *Veterinary Parasitology* , 180(1-2):12-46.
- Jalali, M. H.R., Alborzi, A. R., Avizeh, R., Mosallanejad, B. (2010). A study on *Dirofilaria immitis* in healthy urban dogs from Ahvaz, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 11(4): 358- 362
- Joseph, E., Matthai, A. & Abraham, L. K. (2011). Subcutaneous human dirofilariasis. *Journal of Parasitic Diseases* , 35(2):140-143.
- Kartashev, K., Batashova, I., Kartashov, S., Ermakov, A., Mironova, A., Kuleshova, Y., Ilyasov, B., Kolodiy, I., Klyuchnikov, A., Ryabikina, E., Babicheva, M., Levchenko, Y., Pavlova, R., Pantchev, N., Morchón, R. & Simón, F. (2011).

Canine and Human Dirofilariosis in the Rostov Region (Southern Russia). *Veterinary Medicine International*. [online] Disponível em : <http://www.hindawi.com/journals/vmi/2011/685713/>. Obtido a 2 Fevereiro 2012.

- Knauer, K. W. (1995). Human Dirofilariasis. *Clinical Techntques in SmallAmmal Practice* , 13(2): 96-98.
- Kramer, L. H. (2006).How *Wolbachia/Dirofilaria immitis* interact?. Proceedings of the NAVC North American Veterinary Conference, Orlando, Florida. pp.1024-1025.
- Kramer, L. H. (2007). Chapter 5: Immunopathogenesis of filarial infections in dogs and cats: a role for *Wolbachia* endosymbiont?. In Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G., (Eds.), 2007. *Mappe Parassitologiche: Dirofilaria immitis and D.repens in dog and cat and human infections*. Italy: Rolando Editore. pp. 67-72.
- Kramer, L., Kartashev, V., Grandi, G., Morchón, R., Nagornii, S., Karanis, P. & Simón, F. (2007). Human subcutaneous dirofilariasis, Russia. *Emerging Infectious Diseases* , 13(1):150-152.
- Kramer, L., Grandi, G., Passeri, B., Gianelli, P., Genchi, M., Dzimianski, M.T., Supakorndej, P., Mansour, A.M., Supakorndej, N., McCall, S.D. & McCall, J.W. (2011). Evaluation of lung pathology in *Dirofilaria immitis*-experimentally infected dogs treated with doxycycline or a combination of doxycycline and ivermectin before administration of melarsomine dihydrochloride. *Veterinary Parasitology* , 176(4): 357-360.
- Labarthe, N. & Guerrero, J. (2005). Epidemiology of heartworm: what is happening in South America and Mexico?. *Veterinary Parasitology* , 133(2-3): 149-156.
- Latrofa, M., Weigl, S., Dantas-Torres, F., Annoscia, G., Traversa, D., Brianti, E. & Otranto, D. (2012). A multiplex PCR for the simultaneous detection of species of filarioids infesting dogs. *Acta Tropica* , 122(1): 150-154.
- Ledesma, N. & Harrington, L. (2011). Mosquito Vectors of Dog Heartworm in the United States: Vector Status and Factors Influencing Transmission Efficiency. *Topics in Companion Animal Medicine* , 26(4):178-185.

- Lee, S., Kim, H., Chong, S., Klein, T. & Lee, W. (2007). Molecular survey of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* by direct PCR for wild caught mosquitoes in the Republic of Korea. *Veterinary Parasitology* , 148:149–155.
- Lee, A. C., Montgomery, S. P., Thesis, J. H., Blagburn, L. & Eberhard, M. L. (2010). Public health issues concerning the widespread distribution of canine heartworm disease. *Trends Parasitology* , 26(4): 168-173.
- Lefkaditis, M., Koukeri, S., & Cozma, V. (2010). An endemic area of *Dirofilaria immitis* seropositive dogs at the eastern foothills of Mt Olympus, Northern Greece. *Helminthologia* , 47(1): 3 – 7.
- Leite, L. C., Cirio, S. M., Queiroz, V. S., Silva, M. A., Luz, E., Molinart, H. P., Diniz, J. M. F., Leite, S. C., Lunelli, D., Weber, S. & Zadorosnei. (2006). Dirofilariose Canina: Revisão de uma Zoonose Emergente. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, 4(4):49 - 56.
- Lok, J. B. (1988). *Dirofilaria* sp: taxonomy and distribution. In: Peter F.L., Boreham, P.F.L. & Atwell, R.B. (Eds). *Dirofilariasis*. Boca Raton Florida: CRC Press, pp. 3 - 11.
- Madeira de Carvalho, L. (1994). *Missão de Estudo ao "Laboratório MSD-AGVET España" e à "Facultad de Veterinaria de Madrid" para Aprendizagem da "Técnica de Identificação das Microfilárias Sanguíneas do Cão pelo Estudo Histoquímico da Distribuição da Actividade das Fosfatases Ácidas"*. Lisboa.
- Malmasi, A., Hosseini, S. H., Aramoon, M., Bahonar, A. & Seifi, H. A. (2011). Survey of canine *Dirofilaria immitis* infection in Caspian provinces of Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research* , 12(4): 340-344.
- Manfredi, M., Cerbo, A. & Genchi, M. (2007). Chapter 2: Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. In Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G., (Eds.), 2007. *Mappe Parassitologiche: Dirofilaria immitis and D.repens in dog and cat and human infections*. Italy: Rolando Editore. pp.41 -45.
- Mar, P., Yang, I., Chang, G. & Fei, A. (2002). Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema*

reconditum using primers derived from internal transcribed spacer region 2 (ITS2). *Veterinary Parasitology* , 106: 243–252.

- Martin, C. & Gavotte, L. (2010). The bacteria *Wolbachia* in filariae, a biological russian dolls' system: New Trends in antiparasitic Treatments. *Parasite* , 17(2): 79-89.
- McCall, J. W., Genchi, C., Kramer, L. H. & Venco, L. (2008). Heartworm Disease in Animals and Humans. *Advances in Parasitology* , 66: 193 - 285.
- McCall, J., Kramer, L., Genchi, C., Guerrero, J., Dzimirski, M., Supakorndej, P., Grandi, G. & Carsone, B. (2011). Effects of doxycycline on early infections of *Dirofilaria immitis* in dogs. *Veterinary Parasitology* , 176(4): 361-367.
- Merçot, H., & D., P. (2009). Infection by *Wolbachia*: from passengers to residents. *Comptes Rendus Biologies* , 332: 284-297.
- Milanez de Campos, J.R., Barbas, C.S.V., Filomeno, L. T. B, Fernandez, A., Minamoto, H., Filho, J. V. B. & Jatene, F. B. (1997). Human Pulmonary Dirofilariasis : Analysis of 24 Cases From São Paulo, Brazil. *Chest* , 112: 729-33.
- Montoya, J. M., Ferrer, O., Molina, J. & Corbera, J. (1998). The prevalence of *Dirofilaria immitis* in Gran Canaria, Canary Islands, Spain (1994-1996). *Veterinary Parasitology* , 75(2-3): 221-226.
- Montoya, J., Morales, M., Juste, M. & Corbera, J.A. (2007). Chapter 14: Heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs: current update in Spain,. In Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G., (Eds.), 2007. *Mappe Parassitologiche: Dirofilaria immitis and D.repens in dog and cat and human infections*. Italy: Rolando Editore. pp.175-180
- Montoya-Alonso, J., Mellado, I., Carretón, E., Cabrera-Pedrero, E., Morchón, R. & Simón, F. (2010). Canine dirofilariosis caused by *Dirofilaria immitis* is a risk factor for the human population on the island of Gran Canaria, Canary Islands, Spain. *Parasitology Research* , 107(5):1265-1269.
- Muro, A., Genchi, C., Cordero, M. & Simón, F. (1999). Human Dirofilariasis in the European Union. *Parasitology Today* , 15(9): 386-389.

- Nelson, C. (2008). *Dirofilaria immitis* in cats: diagnosis and management. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* , 30(7): 393-400.
- Nematollahi, A. & Barazandeh, M. A. (2010). A Survey on *Dirofilaria immitis* Occurrence in Stray Dogs of Tabriz (Iran). *Acta Veterinaria Brno* , 79: 449-451.
- Orihel, T. C. & Eberhard, M. L. (1998). Zoonotic Filariasis. *Clinical Microbiology Reviews* , 11(2): 366–381.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F. & Breitschwerdt, E. B. (2009a). Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends in Parasitology* , 25 (4): 157 - 163.
- Otranto, D., Capelli, G. & Genchi, C. (2009b). Changing distribution patterns of canine vector borne diseases in Italy: leishmaniosis vs. dirofilariosis. *Parasites & Vectors*, 2(Suppl 1):S2.
- Otranto, D. & Dantas-Torres, F. (2010). Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasites & Vectors* , 3: 2.
- Otranto, D. & Eberhard, M. L. (2011). Zoonotic helminths affecting the human eye. *Parasites & Vectors*, 4:41.
- Pampiglione, S. & Rivasi, F. (2000). Human dirofilariasis due to *Dirofilaria (Nochtiella) repens*: an update of world literature from 1995 to 2000. *Parassitologia* , 42: 231-254.
- Pampiglione, S., Rivasi, F. & Gustinelli, A. (2009). Dirofilarial human cases in the Old World, attributed to *Dirofilaria immitis*: a critical analysis. *Histopathology* , 54(2): 192-204.
- Pantchev, N., Schaper, R., Limousin, S., Norden, N., Weise, M. & Lorentzen, L. (2009a). Occurrence of *Dirofilaria immitis* and tick-borne infections caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* in domestic dogs in France: results of a countrywide serologic survey. *Parasitology Research* , 105 (Supl 1): S101-114.

- Pantchev, N., Norden, N., Lorentzen, L., Rossi, M., Rossi, U., Brand, B. & Dyachenko, V. (2009b). Current surveys on the prevalence and distribution of *Dirofilaria* spp. in dogs in Germany. *Parasitology Research* , 105(1): 63-S74.
- Peribáñez, M., Lucientes, J., Arce, S. M., Castillo, J. & Gracia, M. (2001). Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Acanthocheilonema dracunculoides* microfilariae by staining with a commercial kit, Leucognost-SP®. *Veterinary Parasitology* , 102(1-2): 173-175.
- Perreira da Fonseca, I. M., Madeira de Carvalho, L. M. & Carvalho-Varela, M. (1991). Prevalência da dirofilariose na população canina portuguesa. I. Detecção de Microfilárias sanguíneas . *Veterinária Técnica Set/Out 1991* , pp. 36-38.
- Piergili-Fioretti, D., Diaferia, M., Grelloni, V. & Maresca, C. (2003). Canine filariosis in Umbria: an update of the occurrence one year after the first observation of autochthonous foci. *Parassitologia*, 45(2): 79-83, Resumo. Disponível em National Center for Biotechnology Information (NCBI). Consultado a 21 Abril 2012.
- Poppert, S., Hodapp, M., Krueger, A., Hegasy, G., Niesen, W., Kern, W. & Tannich, E. (2009). *Dirofilaria repens* infection and concomitant meningoencephalitis. *Emerging Infectious Diseases* , 15(11): 1844-1846.
- Prichard, R. (1997). Application of molecular biology in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology* , 71(2-3): 155-175.
- Raccurt, C. P. (2000). La dirofilariose humaine en France: nouvelles données confirmant la transmission humaine de *Dirofilaria repens* au nord de la latitude 46° nord. *Medecine Tropicale* , 60(3): 308-309.
- Rani, P. A., Irwin, P. J., Gatne, M., Coleman, G. T., McInnes, L. M. & Traub, R. J. (2010). A survey of canine filarial diseases of veterinary and public health significance in India. *Parasites & Vectors* , 3:30.
- Ranjbar-Bahadori, S., Eslami, A. & Bokaic, S. (2007). Evaluation of different methods for diagnosis of *Dirofilaria immitis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* , 10(11): 1938-1940.

- Reifur, L., Thomaz-Soccol, V. & Montiani-Ferreira, F. (2001). Aspectos biológicos que influenciam na existências e na propagação da dirofilariose. Arquivos de CiênciasVetetrinárias e Zoologia *UNIPAR* , 4(1): 65-70.
- Ribeiro, H., Ramos, H. C. & Pires, C. A. (1983). Contribuição para o Estudo dos Vectores das Filariases Animais em Portugal. *Jornal da Sociedade das Ciências Médicas de Lisboa* , 147:143-146.
- Rodrigues-Silva, R., Moura, H., Dreyer, G. & Rey, L. (1995). Human Pulmonary Dirofilariasis: A Review. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* , 37(6): 523-530.
- Rokni, M. B. (2008). The present status of human helminthic diseases in Iran. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* , 102(4): 283–295.
- Roncalli, R. A., Yamane, Y. & Nagata, T. (1998). Prevalence of *Dirofilaria immitis* in cats in Japan. *Veterinary Parasitology* , 75(1): 81-89.
- Rossi, M., Aguiar-Alves, F., Santos, S., Paiva, J., Bendas, A., Fernandes, O. & Labarthe, N. (2011). Detection of *Wolbachia* DNA in blood from dogs infected with *Dirofilaria immitis*. *Experimental Parasitology* , 126(2): 270-272.
- Sano, Y., Aoki, M., Takahshi, H. M., Komatsu, M., Y., A., Kakino, J. & Itagaki, T. (2005). The first record of *Dirofilaria immitis* infection in a Humboldt penguin, *Spheniscus humboldti*. *Journal of Parasitology* , 91(5): 1235-1237, Resumo. Disponível em National Center for Biotechnology Information (NCBI). Consultado a 22 Maio 2012.
- Scaramozzino, P., Gabrielli, S., Di Paolo, M., Sala, M., Scholl, F. & Cancrini, G. (2005). Dog filariosis in the Lazio region (Central Italy): first report on the presence of *Dirofilaria repens*. *BMC Infectious Diseases* , 5:75.
- Schrey, C. F. & Trautvetter, E. (1998). Canine and feline heartworm disease – diagnosis and therapy. *Waltham Focus* , 8(2): 23-30.
- Sergeant, E.S.G. (2009) Epitools epidemiological calculators. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease. Available at: <http://epitools.ausvet.com.au>

- Serrano, F., Frontera, E., Gómez, L., Habela, M., Pérez, J. & Reina, D. (2010). *Manual Prático de Parasitologia Veterinaria*. Cáceres: Universidad Extremadura. pp.115
- Serrão, M. L. (2004). *Competência Vetorial de Aedes albopictus (SKUSE, 1894) Provenientes do estado do Rio de Janeiro, Brasil, paraDirofilaria immitis (Leidy, 1856) Railliet Henry,1911*. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Tese de Doutoramento , Instituto de Veterinária - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Service, M. (1993). Mosquitoes (Culicidae). In Lane, R.P & Crosskey, R. W. *Medical Insects and Arachnids*. London, Chapman & Hall. pp. 120-240.
- Shearer, P. (2011). *Literature Review – Heartworm Disease* . BARK White Papers, [online]. Disponível em <http://www.banfield.com/Banfield/files/b2/b26aea73-be96-4266-a4fa83f54c851edb.pdf>. Obtido em 16 de Novembro de 2011.
- Simón, F., López-Belmonte, J., Marcos-Atxutegi, C., Morchón, R. & Martín-Pacho, J. (2005). What is happening outside North America regarding human dirofilariasis?. *Veterinary Parasitology* , 133(2-3): 181-189.
- Simón, F., Kramer, L., Morchón, R. & Genchi, C. (2007). Chapter 6: A possible role for *Wolbachia* in the diagnosis of *Dirofilaria*. In Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G., (Eds.), 2007. *Mappe Parassitologiche: Dirofilaria immitis and D.repens in dog and cat and human infections*. Italy: Rolando Editore. pp.74-80.
- Simón, F., Morchón, R., Rodríguez-Barbero, A., López-Belmonte, J., Grandi, G. & Genchi, C. (2008). *Dirofilaria immitis* and *Wolbachia*-derived antigens: Its effect on endothelial mammal cells. *Veterinary Parasitology* , 158(3): 223-231.
- Simón, F., Morchón, R.,González-Miguel, J. & Marcos-Atxutegi, M. (2009). What is new about animal and human dirofilariosis? *Trends in Parasitology* , 25(9): 404-409.
- Slatko, B. E., Taylor, M. J. & Foster, J. M. (2010). The *Wolbachia* endosymbiont as an anti-filarial nematode target. *Symbiosis* , 51: 55-65.

- Sousa, S., Pimentel, M., Silva, A. & Madeira de Carvalho, L. M. (2008). Poster 89: Dirofilariose canina no Distrito de Coimbra. *Livro de Resumos do IV Congresso de Ciências Veterinárias da SPCV, I Congresso Ibérico de Epidemiologia, INRB-INIA/Fonte Boa, 27-29 de Novembro 2008*, pp.197.
- Szénási, Z., Kovács, A., Pampiglione, S., Fioravanti, M., Kucsera, I., Tánzos, B. & Tiszlavicz, L. (2008). Human dirofilariosis in Hungary: an emerging zoonosis in central Europe. *Wiener Klinische Wochenschrift* , 120(3-4): 96-102.
- Tarello, W. (2011). Clinical Aspects of Dermatitis Associated with *Dirofilaria repens* in Pets: A Review of 100 Canine and 31 Feline Cases (1990–2010) and a Report of a New Clinic Case Imported from Italy to Dubai. *Journal of Parasitology Research*. [online] Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3238394/pdf/JPR2011-578385.pdf>. Obtido em 2 Maio 2012.
- Tasic, A., Tasic, S., Miladinovic-Tasic, N., Zdravkovic, D. & Djordjevi, J. (2007). *Dirofilaria Repens*-Potential Danger To Human Health. *Acta Medica Medianae*, 46(3): 52-55.
- Theis, J., Gilson, A., Simon, G., Bradshaw, B. & Clark, D. (2001). Case report: Unusual location of *Dirofilaria immitis* in a 28-year-old man necessitates orchiectomy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* , 64(5-6): 317-22.
- Theis, J. (2005). Public health aspects of dirofilariasis in the United States. *Veterinary Parasitology* , 133(2-3):157-180.
- Tiawsirisup, S., Thanapaisarnkit, T., Varatorn, E., Apichonpongsa, T., Bumpenkiattikun, N., Rattanapuchpong, S., Chungpiwat, S., Sanprasert, V. & Nuchprayoon, S. (2010). Canine Heartworm (*Dirofilaria immitis*) Infection and Immunoglobulin G Antibodies Against *Wolbachia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in Stray Dogs in Bangkok, Thailand. *Thai Journal of Veterinary Medicine* , 40(2): 165-170.
- Torgerson, P. R. & Macpherson, C. N. (2011). The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: Global trends. *Veterinary Parasitology* , 182: 79-95.

- Traversa, D., Aste, G., Milillo, P., Capelli, G., Pampurini, F., Tunesi, C., Santori, D., Paoletti, B. & Boari, A. (2010a). Autochthonous foci of canine and feline infections by *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in central Italy. *Veterinary Parasitology*, 169(1-2):128–132.
- Traversa, D., Di Cesare, A. & Conboy, G. (2010b). Canine and feline cardiopulmonary parasitic nematodes in Europe: emerging and underestimated. *Parasites & Vectors*, 3:62
- Trotti, G. C., Pampiglione, S. & Rivasi, F. (1997). The species of the genus *Dirofilaria* Railliet & Henry, 1911. *Parassitologia*, 39(4): 369-374.
- Venco, L. (2007a). Chapter 8: Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in dogs. In Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G., (Eds.), 2007. *Mappe Parassitologiche: Dirofilaria immitis and D.repens in dog and cat and human infections*. Italy: Rolando Editore. pp.118-125.
- Venco, L. (2007b). Chapter 10: *Dirofilaria (Nochtiella) repens* infection in dogs and cats. In Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G., (Eds.), 2007. *Mappe Parassitologiche: Dirofilaria immitis and D.repens in dog and cat and human infections*. Italy: Rolando Editore. pp. 134-136.
- Vezzani, D., Carbajo, A., Fontanarrosa, M., Scodellaro, C., Basabe, J., Cangiano, G. & Eiras, D.F. (2011). Epidemiology of canine heartworm in its southern distribution limit in South America: Risk factors, inter-annual trend and spatial patterns. *Veterinary Parasitology*, 176(2-3): 240-249.
- Villeneuve, A., Goring, J., Marcotte, L. & Overvelde, S. (2011). Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, and *Dirofilaria immitis* among dogs in Canada. *Canadian Veterinary Journal*, 52(5): 527-530.
- Watts, K., Courteny, C. & Reddy, G. (1999). Development of a PCR- and probe-based test for the sensitive and specific detection of the dog heartworm, *Dirofilaria immitis*, in its mosquito intermediate host. *Molecular and Cellular Probes*, 13(6): 425-430.

- Yildirim, A., Inci, A., Duzlu, O. B., Ica, A. & Sahin, I. (2011). *Aedes vexans* and *Culex pipiens* as the potential vectors of *Dirofilaria immitis* in Central Turkey. *Veterinary Parasitology* , 178(1-2): 143-147.

10 - ANEXOS

ANEXO I - Reagentes para a técnica das fosfatases ácidas

✓ Tampão acetato de veronal (pH 10)

Acetato de sódio (“Sigma-Aldrich[®]”)9,714 g

Barbital sódico (“Sigma-Aldrich[®]”)14,714 g

Água destilada500 ml

Nota: Para acertar o pH, utilizamos HCl (Cloreto de Hidrogénio), caso o pH seja superior a 10, ou NaOH (Hidróxido de Sódio), caso o pH seja inferior a 10. Armazenar a 4°C.

✓ Naftol AS-TR fosfato

Naftol AS-TR fosfato, sal sódico (“Sigma-Aldrich[®]”)0,05 g

N,N - dimetilformamida (“Sigma-Aldrich[®]”)5,0 ml

Nota : Preparar apenas antes da utilização.

✓ Pararosanilina

Hidrocloreto de pararosanilina (“Sigma-Aldrich[®]”)1,0 g

Água destilada20,0 ml

Ácido clorídrico concentrado.....5,0 ml

Nota: Adicionar a pararosanilina à água, aquecer e agitar para facilitar a sua dissolução. Misturar o HCl e deixar arrefecer. Armazenar à temperatura de 4°C.

✓ Nitrato de sódio (NaNO₂) a 4%

NaNO₂ (“Sigma-Aldrich[®]”).....4,0g

Água destilada100ml

Nota: Armazenar a 4°C.

✓ Verde de metilo a 1% em tampão fosfato

➤ NaHPO_4 a 0,2 M (Solução A)

NaHPO_4 (“Sigma-Aldrich[®]”)28,396g

Água destilada1000ml

➤ Ácido cítrico a 0,1M (Solução B)

Ácido cítrico (“Sigma-Aldrich[®]”)21,011g

Água destilada1000ml

➤ Solução de trabalho

Solução A77,1ml

Solução B122,9ml

Verde de metilo 2,0g

Nota: Pode manter-se à temperatura ambiente.

✓ Hidróxido de sódico a 0,1N

NaOH (“Sigma-Aldrich[®]”)40g

Água destilada1000ml